



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos en  
Sedimentos Marinos Subantárticos: Estudios  
Poblacionales y Metagenómicos**

Presentada por Lilian Marcela Guibert

Rosario, Argentina

2014

# **Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos en Sedimentos Marinos Subantárticos: Estudios Poblacionales y Metagenómicos**

Lilian Marcela Guibert

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en Laboratorio de Microbiología Ambiental, Centro Nacional Patagónico, dependiente del CONICET, durante el período comprendido entre el 17 de diciembre de 2009 y el 12 de diciembre de 2014, bajo la dirección de las Dras. Mariana Lozada y Hebe Dionisi.

*A mi familia y a Ezequiel*

## ***Agradecimientos***

*No se confundan, esta es la parte más importante de la tesis, porque sin la ayuda y el apoyo de estas personas nada de esto hubiera sido posible.*

*Quiero agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional, por la confianza, por escuchar, por los consejos, por las visitas y los llamados que ayudaron a acortar las distancias.*

*A Eze, por todo, por estar a mi lado en los buenos y en los malos momentos, por hacerme reír, por la paciencia y la contención, por bajarme a la realidad, y por la asistencia informática.*

*A la familia de Eze, por integrarme a su familia y hacerme sentir cómoda. A los padres de Eze por su ayuda y su confianza. A Pili por su magia y su hermosura.*

*Quiero agradecer a mis directoras Mariana y Hebe, por su trabajo de dirección y acompañamiento a lo largo de esta tesis, y todo lo que eso implica. Por las correcciones a último momento (hasta altas horas de la noche, Mariana sabe de lo que estoy hablando...), los consejos, y las levantadas de ánimo para seguir adelante.*

*Quiero agradecer a mis grandes compañeras de aventuras laboratoriles y demás: Magui y Clau, por estar desde el principio, haciendo el aguante, haciendo mucho mejor el trabajo de cada día, por los mates revividores y los tererés de gustos exóticos. Por integrarme a la vida de Madryn, y ayudarme a que no me sintiera sola. Al resto de mis amigos de Madryn, Sole, Agus, Nati Muffin, Juli, Jime, Lau, Poly, Ana, Gabi, Noe, Marian, Nati Pessaq, Jose, Gastón, Juanpi, Lucas, Lucio, también por su amistad, por las risas y los momentos compartidos, y (ya se los dije) por enseñarme que los amigos también pueden ser familia. Sole, roommate compañera de aventuras de la casa cero!. Agus, Clau, Juli, Mari, compañeras de aventuras pileteras, confidentes, y a las “lechuzas” gracias por el fútbol!. Muffin, gracias por la compañía, las llamadas de larga duración, y las visitas. Magui, Clau, Agus, Sole y Muffin, gracias por el apoyo desde que volví a Rosario para darme fuerzas para terminar esta tesis.*

*A mis amigos de toda la vida: Ana, Maru, Vir, y Fede, por tantos años de amistad y momentos compartidos, por hacerme sentir que nada había cambiado a pesar de la distancia.*

*A todos mis compañeros del CENPAT, en especial a los integrantes del Laboratorio de Oceanografía y Contaminación de Aguas del CENPAT, por permitirme utilizar sus instalaciones, por los análisis, y por recolectar las muestras de Bahía Ushuaia.*

*Al trabajo y la predisposición de mis tutores Christian Magni y Alejandra Mussi.*

*Por último, quisiera agradecer al CONICET por otorgarme las becas doctorales que permitieron financiar mis estudios.*

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron divulgados en las revistas y congresos que se detallan a continuación:

***Trabajos publicados:***

Guibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Dionisi HM, Lozada M. *Alkane Biodegradation Genes from Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments and Their Shifts in Response to Oil Exposure*. Microb Ecol (2012) 64:605–616. DOI 10.1007/s00248-012-0051-9. (Capítulos 1 y 2).

***Trabajos en preparación:***

Guibert LM, Loviso CL, Jansson J, Dionisi HM, Lozada M. *Contribution of Bacteroidetes and Planctomycetes to alkane biodegradation potential in the metagenome of Subantarctic marine sediments*. (Manuscrito en preparación, fecha probable de envío a la revista Microbial Ecology: fines del 2014 o principios del 2015). (Capítulo 3).

Loviso CL, Guibert LM, Sarango-Cárdenas SV, Lozada M, Dionisi HM. *Metagenomic fragments containing multiple ring-hydroxylating oxygenase genes belong to ecologically-relevant bacteria inhabiting polluted Subantarctic sediments*. (Enviado para publicación, revista International Microbiology). (Capítulo 3)

***Trabajos presentados en congresos:***

Guibert, L., Loviso, C., Jansson, J., Dionisi, H., Lozada, M. *Identification of gene clusters involved in alkane biodegradation from polluted subantarctic sediments by two complementary metagenomic approaches*. IX Congreso de Microbiología General Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Rosario, 5-7 agosto 2013.

Loviso, C., Guibert, L., Sarango, S., Lozada, M., Dionisi, H. *Screening of a Metagenomic Library from Polluted Subantarctic Sediments for the Identification of Gene Clusters Involved in Hydrocarbon Biodegradation*. American Society for Microbiology 113th General Meeting. Denver, EEUU, 18–21 mayo 2013.

Guibert, L., Loviso, C., Sarango, S., Marcos, M., Lozada, M., Dionisi, H. *Culture-independent and metagenomic analyses of hydrocarbon-degrading bacteria from polluted subantarctic*

*marine sediments*. VI Simpósio de Microbiología Aplicada. Porto Alegre, Brasil, 5-8 noviembre 2012.

Loviso, C., Guibert, L., Marcos, M., Di Marzio, W., Lozada M., Dionisi, H. *Characterization and metagenomic analysis of bacterial genes encoding key enzymes for hydrocarbon degradation in Subantarctic marine sediments*. New Horizons in Biotechnology. Trivandrum, India, 21 -24 noviembre 2011.

Guibert, L., Loviso, C., Marcos, M., Commendatore, M., Dionisi, H., Lozada, M. *Comunidades bacterianas de sedimentos costeros subantárticos y sus cambios como consecuencia de la exposición a petróleo crudo*. II Jornada de Becarios del CENPAT-CONICET. Puerto Madryn, 11 noviembre 2011. ISBN 978-987-26951-0-1

Guibert, L., Loviso, C., Marcos, M., Dionisi, H., Lozada, M. *Alkane monooxygenase gene diversity in subantarctic marine sediments*. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn, 30 noviembre - 3 diciembre 2010.

Loviso, C., Guibert, L., Marcos, M., Di Marzio, W., Lozada, M., Dionisi, H. *Metagenomic analysis of aromatic ring-hydroxylating dioxygenases from cold marine environments*. XLVI Reunión Anual SAIB. Puerto Madryn, 30 noviembre - 3 diciembre 2010.

Marcos, M., Loviso, C., Guibert, L., Lozada, M., Dionisi, H. *Novel molecular approaches for studying microbiol communities*. XLV Reunión Anual SAIB. Tucumán, noviembre 2009.

# ÍNDICE GENERAL

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abreviaturas y símbolos .....</b>   | <b>i</b>   |
| <b>Lenguaje especial .....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>1 Resumen .....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>2 Introducción .....</b>  | <b>4</b>   |
| 2.1 Los hidrocarburos .....  | 4          |
| 2.1.1 Fuentes de hidrocarburos en el ambiente marino .....                                       | 4          |
| 2.1.2 Fuentes de hidrocarburos en la costa Patagónica .....                                      | 5          |
| 2.2 Biodegradación de alcanos .....  | 6          |
| 2.2.1 Mecanismos de acceso.....  | 7          |
| 2.2.2 Enzimas involucradas en la activación aeróbica de alcanos .....                            | 8          |
| 2.2.2.1 Metano monooxigenasas (MMO).....   | 9          |
| 2.2.2.2 Enzimas relacionadas a la familia MMO .....  | 10         |
| 2.2.2.3 Alcano hidroxilasas de la familia AlkB.....  | 10         |
| 2.2.2.4 Monooxigenasas citocromo P450.....   | 12         |
| 2.2.2.5 Alcano hidroxilasas para alcanos de cadena larga .....                                   | 12         |
| 2.2.3 Organización génica y mecanismos de regulación .....                                       | 13         |
| 2.2.3.1 Pseudomonas putida .....   | 14         |
| 2.2.3.2 Alcanivorax borkumensis .....  | 17         |
| 2.2.4 Evolución molecular y transferencia horizontal .....                                       | 18         |
| 2.2.5 Biodegradación en el ambiente marino.....  | 19         |
| 2.2.5.1 Bacterias marinas degradadoras .....   | 19         |
| 2.2.5.2 Biodegradación en zonas frías.....   | 20         |
| 2.3 El estudio de microorganismos ambientales mediante técnicas independientes del cultivo ..... | 21         |
| 2.3.1 Estrategias basadas en el estudio de una familia de genes.....                             | 22         |
| 2.3.1.1 Genes marcadores filogenéticos y funcionales .....                                       | 22         |
| 2.3.1.2 Construcción de bibliotecas de productos de amplificación .....                          | 22         |
| 2.3.1.3 Secuenciación en gran escala .....   | 23         |
| 2.3.2 Metagenómica: técnicas basadas en el estudio conjunto del metagenoma.....                  | 25         |
| 2.3.2.1 Bibliotecas metagenómicas.....   | 25         |
| 2.3.2.2 Secuenciación al azar del metagenoma.....  | 26         |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.4      | Objetivos de esta Tesis .....  | 27        |
| <b>3</b> | <b>Materiales Y Métodos .....</b>  | <b>30</b> |
| 3.1      | Soluciones .....   | 30        |
| 3.2      | Cepas bacterianas, vectores de clonado y oligonucleótidos.....                             | 30        |
| 3.3      | Medios de cultivo .....  | 31        |
| 3.4      | Preparación de células competentes.....  | 32        |
| 3.5      | Muestreo de sedimentos marinos.....  | 32        |
| 3.6      | Construcción de sistemas experimentales de sedimento y agua de mar<br>.....                | 33        |
| 3.7      | Análisis fisicoquímicos y ambientales .....  | 33        |
| 3.7.1    | Determinación de hidrocarburos alifáticos .....  | 33        |
| 3.8      | Manipulación de ácidos nucleicos .....   | 34        |
| 3.8.1    | Cuantificación de ADN.....   | 34        |
| 3.8.2    | Electroforesis en geles de agarosa.....  | 35        |
| 3.8.3    | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....   | 35        |
| 3.9      | Construcción y análisis de bibliotecas de fragmentos de genes <i>alkB</i> ...              | 36        |
| 3.9.1    | Extracción de ADN metagenómico .....   | 36        |
| 3.9.2    | Amplificación y clonado de fragmentos de genes <i>alkB</i> .....                           | 36        |
| 3.9.3    | Secuenciación .....  | 37        |
| 3.9.4    | Análisis de las secuencias de fragmentos de genes <i>alkB</i> .....                        | 37        |
| 3.10     | Análisis basados en la secuenciación en gran escala de amplicones<br>del gen ARNr 16S..... | 38        |
| 3.10.1   | Pirosecuenciación de amplicones del gen ARNr 16S .....                                     | 38        |
| 3.10.2   | Análisis bioinformáticos y estadísticos de las secuencias.....                             | 39        |
| 3.10.2.1 | Tratamiento previo de las secuencias de fragmentos de genes ARNr 16S.....                  | 39        |
| 3.10.2.2 | Análisis basados en OTUs .....   | 40        |
| 3.10.2.3 | Análisis basados en la asignación taxonómica de las secuencias.....                        | 40        |
| 3.11     | Construcción de la biblioteca metagenómica OR07-BM.....                                    | 41        |
| 3.11.1   | Extracción de ADN metagenómico .....   | 41        |
| 3.11.2   | Obtención y almacenamiento de los clones .....   | 41        |
| 3.11.3   | Búsqueda de los clones conteniendo genes <i>alkB</i> .....                                 | 42        |
| 3.11.4   | Preparación de los fósmidos seleccionados para su secuenciación .....                      | 43        |



|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.11.5    | Secuenciación y ensamblado .....  | 44        |
| 3.11.6    | Predicción de genes y anotación .....   | 45        |
| 3.11.7    | Asignación taxonómica .....   | 45        |
| 3.11.8    | Comparación con otros genomas .....   | 46        |
| 3.12      | Análisis de secuencias AlkB del set de datos de secuenciación al azar del metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia.....                                      | 46        |
| 3.12.1    | Búsqueda in silico de secuencias AlkB.....  | 47        |
| 3.12.2    | Clasificación de las secuencias AlkB .....  | 47        |
| 3.12.3    | Clasificación con MEGAN4.....   | 47        |
| 3.12.3.1  | Construcción de árboles filogenéticos .....   | 47        |
| 3.12.4    | Análisis de los segmentos contiguos (contigs) .....   | 48        |
| 3.13      | Números de acceso.....  | 48        |
| <b>4</b>  | <b>Resultados y Discusión .....</b>   | <b>51</b> |
| 4.1       | Capítulo 1: Diversidad de poblaciones bacterianas con potencial de degradación de alcanos en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia .....                       | 51        |
| 4.1.1     | Introducción .....  | 51        |
| 4.1.2     | Resultados.....   | 54        |
| 4.1.2.1   | Sitio de estudio .....  | 54        |
| 4.1.2.2   | Caracterización de los sedimentos costeros de Bahía Ushuaia .....   | 55        |
| 4.1.2.2.1 | Contenido de hidrocarburos alifáticos.....  | 56        |
| 4.1.2.2.2 | Índices de diagnóstico.....   | 57        |
| 4.1.2.3   | Diversidad de secuencias de genes <i>alkB</i> .....   | 58        |
| 4.1.2.3.1 | Construcción y análisis de bibliotecas de fragmentos de genes <i>alkB</i> .....   | 58        |
| 4.1.2.4   | Descripción de la comunidad bacteriana proveniente de la muestra OR08.....  | 67        |
| 4.1.2.4.1 | Análisis de amplicones del gen ARNr 16S.....  | 67        |
| 4.1.3     | Discusión .....   | 71        |
| 4.2       | Capítulo 2: Cambios en la comunidad bacteriana proveniente de una muestra de sedimento costero de Bahía Ushuaia frente a la exposición a petróleo crudo ..... | 76        |
| 4.2.1     | Introducción .....  | 76        |
| 4.2.2     | Resultados.....   | 77        |
| 4.2.2.1   | Experimentos de exposición a petróleo crudo y de bioestimulación.....   | 77        |
| 4.2.2.1.1 | Biodegradación de alcanos .....   | 78        |
| 4.2.2.1.2 | Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana .....   | 81        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 4.2.2.1.3   | Cambios observados en la diversidad de secuencias de genes <i>alkB</i> .....   | 85         |
| 4.2.3       | Discusión .....  | 88         |
| 4.3         | Capítulo 3: Análisis metagenómico de Alcano monooxigenasas AlkB: identificación y análisis de fragmentos genómicos conteniendo secuencias de genes <i>alkB</i> en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia ..... | 93         |
| 4.3.1       | Introducción .....   | 93         |
| 4.3.2       | Resultados.....  | 95         |
| 4.3.2.1     | Construcción de un árbol AlkB de referencia.....   | 95         |
| 4.3.2.2     | Clasificación de las secuencias AlkB obtenidas del metagenoma de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia .....  | 99         |
| 4.3.2.2.1   | Búsqueda de secuencias AlkB en el set de datos de secuenciación al azar del metagenoma (identificación in silico).....   | 99         |
| 4.3.2.2.1.1 | Clasificación.....   | 101        |
| 4.3.2.2.2   | Biblioteca metagenómica OR07-BM.....   | 109        |
| 4.3.2.2.2.1 | Identificación de fósidos conteniendo genes <i>alkB</i> .....  | 109        |
| 4.3.2.2.2.2 | Análisis preliminares de los fósidos #401 y #964.....  | 111        |
| 4.3.2.2.2.3 | Secuenciación de los fósidos #401 y #964 .....   | 113        |
| 4.3.2.2.2.4 | Clasificación de las secuencias AlkB de los fósidos #401 y #964 .....  | 114        |
| 4.3.2.3     | Análisis del contexto genómico de los genes <i>alkB</i> .....  | 116        |
| 4.3.2.3.1   | Asignación taxonómica .....  | 116        |
| 4.3.2.3.1.1 | Fragmentos genómicos identificados in silico .....   | 116        |
| 4.3.2.3.1.2 | Biblioteca metagenómica OR07-BM .....  | 117        |
| 4.3.2.3.2   | Organización génica y comparación con genomas relacionados.....  | 119        |
| 4.3.2.3.2.1 | Fragmentos genómicos identificados in silico .....   | 119        |
| 4.3.2.3.2.2 | Biblioteca metagenómica OR07-BM .....  | 120        |
| 4.3.3       | Discusión .....  | 124        |
| 5           | <b>Conclusiones.....</b>   | <b>132</b> |
| 6           | <b>Apéndice .....</b>  | <b>139</b> |
| 7           | <b>Bibliografía .....</b>  | <b>163</b> |

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|   |  |
|---|--|
| °C  | Grados centígrados   |
| ADN   | Ácido Desoxirribonucleico  |
| ARNr  | Ácido Ribonucleico Ribosomal   |
| BLAST                                       | <i>Del inglés: Basic Local Alignment Search Tool</i>   |
| BSA   | <i>Del inglés: Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)   |
| CDS   | <i>Del inglés: Coding DNA Sequence</i>   |
| CTAB  | <i>Del inglés: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> [Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de cetiltrimetilamonio: (C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> )N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br] |
| Da  | Daltons  |
| DO  | Densidad Óptica  |
| DMSO  | Dimetilsulfóxido: CH <sub>3</sub> SOCH <sub>3</sub>  |
| dNTP  | Deoxinucleótido Trifosfato, donde N puede ser A (adenina), C (citosina), G (guanina), T (timina)   |
| EDTA  | <i>Del inglés: Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)   |
| FAD, FADH <sub>2</sub>                      | Flavín Adenín Dinucleótido (forma oxidada y reducida, respectivamente)   |
| g   | Gramos   |
| kb  | Kilopares de bases   |
| l   | Litros   |
| m   | Metros   |
| m-  | Mili (10 <sup>-3</sup> )   |
| M   | Molar  |
| min   | Minutos  |
| μ-  | Micro (10 <sup>-6</sup> )  |
| NAD <sup>+</sup> , NADH<br>respectivamente) | Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada y reducida, respectivamente)  |
| NCBI  | <i>Del inglés: National Center for Biotechnology Information</i>   |

|       |   |
|-------|---|
| ORF   | <i>Del ingles: Open Reading Frame</i>   |
| OTU   | <i>Del ingles: Operational Taxonomic Unit</i>   |
| PCR   | <i>Del inglés: Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)  |
| pb    | Pares de bases  |
| pipes | <i>Del ingles: piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>   |
| p/v   | Peso en volumen   |
| rpm   | Revoluciones por minuto   |
| s     | Segundos  |
| SDS   | <i>Del inglés: Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecilsulfato de sodio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ ) |
| UFC   | Unidades Formadoras de Colonias   |

## LENGUAJE ESPECIAL

*Biofilm*: comunidades de microorganismos que crecen adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo y embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado.

*Blast hits*: conjunto de secuencias obtenidas como resultado de realizar una comparación de una secuencia de interés contra alguna de las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando alguno de los algoritmos BLAST.

*In silico*: hecho por computadora o vía simulación computacional.

---

# RESUMEN

---

# 1 RESUMEN

La costa Patagónica se encuentra expuesta a la contaminación por hidrocarburos de origen antrópico, los cuales pueden persistir en los sedimentos costeros, sobre todo en regiones frías. La biodegradación mediada por bacterias autóctonas constituye un mecanismo importante de eliminación de estos contaminantes del medio ambiente. El objetivo general de esta Tesis fue incrementar nuestro conocimiento sobre las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos alifáticos en sedimentos costeros crónicamente contaminados de ambientes subantárticos (Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego). Para ello, se emplearon diferentes técnicas moleculares independientes del cultivo de microorganismos, basadas tanto en el análisis de genes marcadores funcionales, marcadores filogenéticos, así como también estrategias metagenómicas. Como marcador funcional se utilizaron los genes *alkB*, que codifican para la subunidad catalítica del complejo enzimático Alcano hidroxilasa AlkB, una familia de enzimas clave en el metabolismo aeróbico de alcanos. Se observó la existencia de una gran diversidad de variantes de genes *alkB* en los sedimentos de Bahía Ushuaia, con una predominancia de secuencias relacionadas al filo Proteobacteria, y Actinobacteria en segundo lugar. Al analizar una muestra representativa de sedimentos por secuenciación en gran escala de amplicones del gen para el ARN ribosomal 16S, se observó una comunidad dominada por géneros bacterianos conocidos por su capacidad de degradar hidrocarburos o que se han visto asociadas a la biodegradación a bajas temperaturas: *Oleispira*, *Pseudoalteromonas*, *Glaciecola*, y *Psychrobacter*. Asimismo, miembros del clado Roseobacter (Alphaproteobacteria), y del género *Nocardioides* (Actinobacteria) también fueron abundantes. Evaluamos la respuesta de la comunidad bacteriana frente a una exposición experimental a petróleo crudo con y sin el agregado de nutrientes. La comunidad bacteriana del sedimento respondió rápidamente, observándose cambios tanto a nivel funcional como estructural. A nivel funcional, se identificaron secuencias de genes *alkB* que pueden ser consideradas relevantes ecológicamente, y que pueden ser utilizadas para el desarrollo de herramientas moleculares de diagnóstico ambiental. A nivel estructural, sugerimos que los miembros del clado Roseobacter, *Maribius* (Alphaproteobacteria), junto con *Nocardioides* (Actinobacteria), serían importantes en los procesos de atenuación natural de hidrocarburos alifáticos en este ambiente. Luego del tratamiento con petróleo crudo y nutrientes, se produce un cambio drástico en la estructura de la comunidad bacteriana, seleccionándose predominantemente los géneros *Alcanivorax* (Gammaproteobacteria) y *Thalassospira* (Alphaproteobacteria). Asimismo, observamos el enriquecimiento de varios géneros que no

habían sido reportados asociados a la biodegradación de hidrocarburos, en particular de los ordenes Caulobacterales y Flavobacteriales.

La utilización de dos estrategias metagenómicas nos permitió seguir ampliando el espectro de diversidad de los genes *alkB* característicos de sedimentos de Bahía Ushuaia, y estudiar aspectos de la organización génica. En conjunto, nuestros resultados indican que la importancia de miembros del filo Bacteroidetes con respecto al potencial de biodegradación de hidrocarburos en ambientes costeros de zonas rías podría haber sido subestimada. Mediante la construcción y el análisis de una biblioteca metagenómica en fósmidos, se identificaron dos fragmentos genómicos (de longitud 33 kb y 38 kb), conteniendo secuencias AlkB de longitud completa y novedosas, como así también genes contiguos potencialmente involucrados en el metabolismo de alcanos y lípidos. Ambos fragmentos genómicos se encontraron relacionados con los genomas de miembros del filo Planctomycetes. No existían hasta el momento reportes de la presencia de genes que codifican para la degradación de alcanos en este grupo filogenético, el cual se encuentra aún muy poco estudiado.

En resumen, el estudio mediante métodos independientes del cultivo de las comunidades microbianas de un ambiente frío crónicamente contaminado de la Patagonia, nos permitió la identificación de genes biomarcadores y microorganismos indicadores para la biodegradación de alcanos en estos ambientes, inferir su posible respuesta a la exposición a petróleo crudo y su comportamiento frente a la bioestimulación con nutrientes, así como también avanzar en el análisis del contexto genómico de algunos de estos genes en grupos microbianos ecológicamente relevantes pero aún poco conocidos.



---

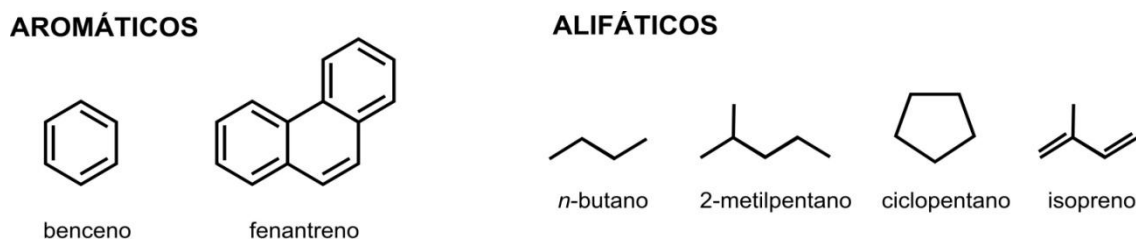
# INTRODUCCIÓN

---

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 LOS HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos de una gran diversidad estructural, producidos mediante biosíntesis por organismos vivos en la biósfera, o como resultado de procesos de transformación geológica de biomasa en sistemas sedimentarios (geósfera). Los hidrocarburos están formados exclusivamente por carbono (C) e hidrógeno (H), y se clasifican como aromáticos o alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos son moléculas planas y cíclicas con un sistema de enlaces dobles conjugados (dos o más enlaces dobles que no están separados por un grupo  $\text{CH}_2$  u otra estructura) (Figura 2.1). Los hidrocarburos alifáticos formados exclusivamente por enlaces C-H simples se denominan hidrocarburos saturados o alcanos, y pueden ocurrir formando cadenas lineales (*n*-alcanos), cadenas ramificadas, o estructuras cíclicas (cicloalcanos) (Figura 2.1). Los hidrocarburos alifáticos insaturados contienen al menos un enlace C-C doble (alquenos), o un enlace C-C triple (alquinos) (Figura 2.1) (Wilkes and Schwarzbauer 2010).



**Figura 2.1.** Estructuras de algunos hidrocarburos aromáticos, alifáticos saturados e insaturados.

#### 2.1.1 FUENTES DE HIDROCARBUROS EN EL AMBIENTE MARINO

Los hidrocarburos derivados del petróleo pueden ingresar en el ambiente marino mediante dos procesos principales. Un proceso involucra las filtraciones naturales de petróleo proveniente de los estratos geológicos bajo el fondo marino. El segundo proceso involucra las actividades humanas relacionadas con la extracción, el transporte, almacenamiento, y la utilización del petróleo y gas natural (Kvenvolden and Cooper 2003; NRC National Research Council 2003). Debido a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos, los sedimentos marinos constituyen repositorios principales de estos compuestos, desde donde pueden acceder las redes tróficas adyacentes. Los invertebrados bentónicos, por ejemplo, acumulan hidrocarburos que luego

pueden estar disponibles para las especies de niveles tróficos superiores (Harris, Yunker et al. 2011). Ciertos organismos marinos son capaces de producir hidrocarburos alifáticos. En sedimentos marinos ocurre la producción de metano por arqueas metanogénicas, y de otros alcanos volátiles de cadena corta (por ejemplo, etano, propano, butano) por una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias aeróbicas y anaeróbicas, arqueas, cianobacterias, y levaduras (Formolo 2010). La biosíntesis de isopreno se encuentra ampliamente distribuida, siendo producido por plantas terrestres, plancton marino, y bacterias. Algunos alcanos de cadena más larga son producidos por microbios eucariotas y procariotas, en particular en ambientes marinos. Por ejemplo, las algas marrones producen n-pentadecano, y las algas rojas producen n-heptadecano (Wackett 2010). El pristano es una sustancia ubicua en el agua de mar, y los microorganismos del zooplancton de los géneros *Calanus* y *Neocalanus* producen pristano (Avigan and Blumer 1968).

### 2.1.2 FUENTES DE HIDROCARBUROS EN LA COSTA PATAGÓNICA

Las costa Patagónica se extiende a lo largo de más de 2000 km entre 40°S y 54°S (Commendatore, Esteves et al. 2000). Debido a su gran productividad y excepcional diversidad, su conservación se ha reconocido como prioritaria tanto a nivel local como global (Olson and Dinerstein 2002; Foro para la Conservación del Mar Patagónico y Áreas de Influencia 2008). Las fuentes de contaminación detectadas son el vertido de efluentes urbanos, metales pesados, basurales a cielo abierto, y los hidrocarburos derivados del petróleo (Foro para la Conservación del Mar Patagónico y Áreas de Influencia 2008). El transporte de petróleo crudo desde las terminales petroleras, localizadas en las costas de Tierra del Fuego, Santa Cruz y Chubut, hasta los sitios de procesamiento en la provincia de Buenos Aires, o hacia el mercado externo, se realiza exclusivamente por mar. Asimismo, parte del combustible refinado que se produce en las zonas de procesamiento también retorna por vía marítima. Por lo tanto, la costa Patagónica se encuentra potencialmente expuesta a la contaminación por hidrocarburos, ya sea como consecuencia de maniobras operacionales (deslastre, vaciado de sentinas, etcétera) como por accidentes. Los derrames también ocurren durante la carga y la explotación costa afuera (*offshore*) (Nievas and Esteves 2007; Foro para la Conservación del Mar Patagónico y Áreas de Influencia 2008). La costa patagónica muestra niveles variables de hidrocarburos derivados del petróleo, lo que refleja diferentes grados de exposición a las actividades humanas. Los sitios con niveles de contaminación moderada a alta corresponden a los puertos de San Antonio Oeste (Río Negro), Rawson, Caleta Córdova, y Comodoro Rivadavia (Chubut). Estos puertos presentan

principalmente actividades pesqueras, dos además constituyen estaciones de carga de petróleo crudo (Caleta Córdova), y de descarga de combustibles livianos (Comodoro Rivadavia). También se han detectado zonas de acumulación de hidrocarburos, debido a las acciones de las corrientes marinas y los vientos predominantes, como es el caso de Faro Aristizábal (Chubut) (Commendatore, Esteves et al. 2000; Commendatore and Esteves 2007). La ciudad de Ushuaia también se encuentra afectada por la contaminación con hidrocarburos, producto de la suma de las actividades desarrolladas en los muelles (Esteves and Amín 2005; Esteves, Commendatore et al. ; Commendatore, Nievas et al. 2012). En particular, en un estudio donde se analizaron los niveles de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en sedimentos de diferentes sitios a lo largo de la Bahía Ushuaia, se concluyó que la zona central de la Bahía, que comprende el Muelle Combustible, el Muelle Comercial, y el Muelle Náutico, constituye una zona de acumulación de hidrocarburos, favorecida por las características de los sedimentos (Commendatore, Nievas et al. 2012).

## 2.2 BIODEGRADACIÓN DE ALCANOS

Los alcanos son los componentes mayoritarios del petróleo crudo, pero también son producidos por varios organismos como ser plantas, algas, bacterias y arqueas, como productos de desecho, elementos estructurales, mecanismos de defensa, o atrayentes químicos (van Beilen, Z. et al. 2003). Los alcanos, al ser moléculas altamente reducidas con un gran contenido de carbono, pueden ser potencialmente una buena fuente de carbono y energía. Sin embargo, su utilización presenta dos grandes impedimentos para los microorganismos. Por un lado, la hidrofobicidad de estos compuestos presenta un desafío en cuanto a su mecanismo de acceso y entrada a la célula (Rojo 2010). Por otro lado, debido a la naturaleza química del enlace C–H, los alcanos son poco reactivos o inertes. Las reacciones principales involucran la ruptura hemolítica de un enlace C–H o C–C, con la formación de radicales libres alquilo como intermediarios. Este proceso requiere una cantidad significativa de energía, que está relacionada con la estabilidad del radical formado, siendo los radicales terciarios los más estables, seguido por los secundarios, y siendo los más inestables los primarios (Wilkes and Schwarzbauer 2010). A pesar de estos factores, varios microorganismos han adquirido la habilidad de degradar alcanos y utilizarlos como fuente de carbono y energía (van Beilen, Z. et al. 2003).

### 2.2.1 MECANISMOS DE ACCESO

Los hidrocarburos en el medio ambiente ocurren predominantemente como líquidos o sólidos inmiscibles en agua, disueltos en solventes no acuosos, en estado gaseoso, o adsorbidos a matrices sólidas, mientras que una pequeña fracción se encuentra disuelta en la fase acuosa (Harms, Smith et al. 2010). La solubilidad en agua de la serie de n-alcanos disminuye exponencialmente a medida que su peso molecular aumenta (Eastcott, Shiu et al. 1988). Asimismo, a medida que la temperatura disminuye también disminuye la solubilidad de los alcanos de más de diez carbonos, y pueden llegar a ser sólidos (Whyte, Slagman et al. 1999). Por lo tanto, los microorganismos degradadores utilizan diferentes estrategias para facilitar la interacción con estos compuestos poco solubles o insolubles en agua. Una estrategia es la producción de biosurfactantes, compuestos anfipáticos que actúan en las interfases alterando sus propiedades: reducen la tensión superficial de los fluidos y promueven la mezcla de fases hidrofóbicas e hidrofílicas. Los biosurfactantes y los bioemulsificadores promueven la emulsificación de los hidrocarburos en agua, aumentan la superficie expuesta al agua de los mismos y su biodisponibilidad, y por lo tanto aceleran su metabolismo. La bacteria marina *Alcanivorax borkumensis* SK2 produce dos formas de un glucolípido biosurfactante: una forma precursora que contiene glicina, unida a la superficie celular, y la forma sin glicina que es liberada al medio extracelular. La presencia de la forma precursora en la superficie celular aumenta la hidrofobicidad de la misma y su afinidad a la superficie del hidrocarburo. Por otro lado, la forma extracelular promueve la formación de micelas de hidrocarburo en agua, aumentando la biodisponibilidad de estos compuestos (Golyshin, Martins Dos Santos et al. 2003). En *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que a bajas concentraciones de biosurfactante ocurría la liberación del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, y como resultado la superficie celular se volvía más hidrofóbica (Al-Tahhan, Sandrin et al. 2000). Otra estrategia es la adhesión a la superficie del hidrocarburo, observada en *Acinetobacter*, mediante la producción de apéndices extracelulares como las fimbrias (Rosenberg, Bayer et al. 1982; Bihari, Pettko-Szandtner et al. 2007). La tercer estrategia de acceso observada es el desarrollo de biofilms en la interfase agua-hidrocarburo (Klein, Grossi et al. 2008). Los biofilms son estructuras multicelulares fisiológica y genéticamente heterogéneas, altamente organizadas. La particularidad de este tipo de biofilms es que el hidrocarburo actúa a la vez como superficie para el desarrollo del biofilm y como sustrato para el crecimiento bacteriano (Grimaud 2010).

Debido a las diferencias estructurales entre la membrana citoplasmática y la membrana externa, se deberían presentar diferentes requerimientos para el transporte de hidrocarburos a través de las mismas. En bacterias Gram-positivas, la entrada a la célula podría ocurrir por

difusión pasiva a través de la membrana citoplasmática, o mediante el uso de sistemas de transporte activo, si bien hasta el momento no se han identificado los genes o las proteínas responsables del transporte de hidrocarburos. Las bacterias Gram-negativas se caracterizan por poseer una membrana externa que actúa principalmente como una barrera de permeabilidad selectiva, por lo que los hidrocarburos no pueden difundir libremente a través de ella (Parales and Ditty 2010). El pasaje de moléculas a través de la membrana externa entonces ocurre a través de diferentes clases de proteínas transportadoras. Por ejemplo, se han identificado proteínas de membrana externa específicas e inducibles para la entrada de hidrocarburos aromáticos como el tolueno (Wang, Rawlings et al. 1995; Kahng, Byrne et al. 2000), m-xileno (Kasai, Inoue et al. 2001), y estireno (Mooney, O'Leary et al. 2006).

Con respecto al transporte de alcanos, la proteína AlkL se propuso inicialmente como posible transportadora debido a su localización en la membrana externa, y a su similitud con las proteínas de membrana externa OmpW de *Escherichia coli* y OprG de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales estarían involucradas en el transporte de moléculas hidrofóbicas a través de la membrana externa (van Beilen, Eggink et al. 1992; Hong, Patel et al. 2006; Touw, Patel et al. 2010). Existen evidencias indirectas de la posible función transportadora de AlkL. En un estudio reciente, en *Escherichia coli* se observó que al aumentar la expresión de AlkL también aumentaba la reacción de oxigenación inicial de compuestos hidrofóbicos (entre ellos los alcanos octano y nonano), y los autores sugirieron que este aumento en la actividad de oxigenación se debía a un aumento del transporte de los sustratos hidrofóbicos a través de la membrana externa, mediado por AlkL (Julsing, Schrewe et al. 2012). Sin embargo, aún no se ha confirmado el rol de la proteína AlkL en el metabolismo de alcanos. En otro estudio donde se analizó el perfil transcripcional de *Alcanivorax borkumensis* SK2 durante el crecimiento en n-hexadecano, se identificó a la lipoproteína de membrana externa Blc como posible transportadora de alcanos, ya que pertenece a una familia de proteínas transportadoras de pequeñas moléculas hidrófobas, tales como lípidos y hormonas esteroideas (Sabirova, Becker et al. 2011).

## 2.2.2 ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA ACTIVACIÓN AERÓBICA DE ALCANOS

En general, la degradación aeróbica de alcanos en bacterias procede a través de la oxidación secuencial del metilo terminal, generando primero un alcohol primario, luego un aldehído, y finalmente un ácido carboxílico. Los ácidos grasos obtenidos entran en el metabolismo general a través de la  $\beta$ -oxidación (Rojo 2010). En algunos microorganismos se han reportado vías de oxidación subterminal (Whyte, Hawari et al. 1998; Kotani, Yamamoto et al.

2003), y biterminal (Broadway, Dickinson et al. 1993; Scheller, Zimmer et al. 1998). Asimismo, existen vías de activación anaeróbica de alcanos (Boll and Heider 2010). Mientras que las enzimas para la oxidación de alcoholes grasos y de ácidos grasos son comúnmente halladas entre los microorganismos, el paso inicial de activación del alcano requiere de sistemas enzimáticos específicos. En esta sección, se describirán las enzimas responsables de la activación aeróbica de alcanos, divididas según el rango de los sustratos utilizados: metano monooxigenasas ( $C_1$ ), enzimas relacionadas con las metano monooxigenasas ( $C_2$ – $C_4$ ), alcano hidroxilasas tipo AlkB y citocromos P450 ( $C_5$ – $C_{16}$ ), y enzimas para la degradación de alcanos mayores a  $C_{16}$  (van Beilen and Funhoff 2007).

### 2.2.2.1 Metano monooxigenasas (MMO)

Las bacterias metanotróficas (o metanotrofos) son únicas en su habilidad de utilizar metano como única fuente de carbono y energía. Constituyen un subgrupo de las bacterias metilotróficas, las cuales pueden crecer a expensas de compuestos de un átomo de carbono (metano, metanol, metilaminas, formiato, formamida, monóxido de carbono, entre otros), y poseen vías para la asimilación de formaldehído, el cual es un intermediario importante en el metabolismo de las bacterias metilotróficas en general. La enzima metano monooxigenasa (MMO) es la responsable de la oxidación inicial del metano a metanol. Existen dos formas de metano monooxigenasas, diferentes estructuralmente y bioquímicamente, una forma soluble (sMMO) y una forma particulada (pMMO). El complejo enzimático pMMO contiene cobre y se encuentra asociado a membranas intracelulares especiales características de los metanotrofos. La sMMO es un complejo enzimático de localización citoplasmática, con dos átomos de hierro en su centro activo. Pertenecce a un grupo grande de oxigenasas de hidrocarburos bacterianas denominadas monooxigenasas solubles bi-hierro (*soluble diiron monooxygenases*, SDIMOs). Estas dos familias de MMOs no comparten similitud al nivel de su secuencia de aminoácidos o en su estructura tridimensional, como tampoco se encuentran relacionadas evolutivamente. Ambas formas enzimáticas pueden co-oxidar un rango de hidrocarburos y compuestos clorados además de su sustrato natural, por lo que tienen un gran potencial biotecnológico (Murrell and Smith 2010).

El metanol es posteriormente oxidado a formaldehído por una metanol deshidrogenasa (MD) dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ), de localización periplasmática. En los metanotrofos, existen múltiples vías para la oxidación de formaldehído a formato. La oxidación de formato a dióxido de carbono mediante la enzima formato deshidrogenasa (FD) dependiente

de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) es el último paso en la vía de oxidación del metano. Los metanotrofos también tienen la capacidad de fijar el formaldehído producido mediante la utilización de la vía de la ribulosa monofosfato (metanotrofos Tipo I) o de la serina (metanotrofos Tipo II) (Smith, Trotsenko et al. 2010).

#### 2.2.2.2 Enzimas relacionadas a la familia MMO

Las enzimas involucradas en la degradación de etano, propano y butano se encuentran relacionadas con la familia de enzimas MMO. *Thauera butanivorans* (llamada anteriormente *Pseudomonas butanovora* (Dubbels, Sayavedra-Soto et al. 2009)) posee una butano monooxigenasa multicomponente soluble (sBMO) formada por una monooxigenasa propiamente dicha que contiene hierro, una NADH-oxidoreductasa, y una proteína regulatoria pequeña. Las características físicas de sBMO son similares a la familia de monooxigenasas solubles bi-hierro (sMMO) de los metanotrofos. Sin embargo, ambos sistemas enzimáticos presentan diferencias en cuanto a sus propiedades catalíticas. *Pseudomonas butanovora* es capaz de crecer en presencia de alcanos C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>, pero no con metano (Sluis, Sayavedra-Soto et al. 2002; Dubbels, Sayavedra-Soto et al. 2007). *Gordonia* sp. TY-5 posee una propano monooxigenasa multicomponente similar a sMMO, capaz de oxidar propano en la posición subterminal, generando 2-propanol (Kotani, Yamamoto et al. 2003). Este alcohol secundario luego es oxidado a acetona, la cual es transformada en acetato de metilo, y finalmente se genera ácido acético y metanol (Kotani, Yurimoto et al. 2007). Se han identificado homólogos a los genes codificantes para la propano monooxigenasa de *Gordonia* sp. TY-5 en otras dos cepas capaces de crecer con propano: *Mycobacterium* sp. TY-6 y *Pseudonocardia* sp. TY-7 (Kotani, Kawashima et al. 2006). *Nocardioides* sp. CF8 posee una butano monooxigenasa asociada a membrana (pBMO) que estaría representando un linaje nuevo dentro de la familia de monooxigenasas particuladas (Rojo 2010; Sayavedra-Soto, Hamamura et al. 2011).

#### 2.2.2.3 Alcano hidroxilasas de la familia AlkB

La vía de degradación de alcanos más extensamente caracterizada se encuentra codificada en el plásmido OCT de *Pseudomonas putida* GPo1 (previamente conocida como *Pseudomonas oleovorans*) (van Beilen, Wubbolts et al. 1994). La primera enzima de esta vía es la Alcano hidroxilasa, formada por tres componentes: una monooxigenasa integral de membrana (AlkB), y dos proteínas solubles asociadas, rubredoxina (AlkG) y rubredoxina reductasa (AlkT) (Figura 2.2 A). AlkB hidroxila a los alcanos en la posición terminal. La reacción procede a través de un



intermediario radical, uno de los átomos de oxígeno es transferido al metilo terminal del alcano mientras que el otro átomo de oxígeno es reducido a H<sub>2</sub>O mediante los electrones transferidos por la rubredoxina (Rojo 2010). Las rubredoxinas son proteínas redox con hierro y azufre, que median el transporte de electrones desde la rubredoxina reductasa, una proteína que reduce su flavín adenín dinucleótido (FAD) a expensas de NADH (van Beilen, Neuenschwander et al. 2002). El plásmido OCT de la cepa GPo1 contiene dos rubredoxinas, AlkF y AlkG (Kok, Oldenhuis et al. 1989). La estructura de AlkG es inusual, ya su tamaño es más de tres veces el de otras rubredoxinas bacterianas. Contiene dos dominios, AlkG1 y AlkG2, conectados por un segmento de 70 aminoácidos, mientras que las rubredoxinas de otros microorganismos contienen sólo uno de estos dominios. Análisis de las secuencias y estudios de complementación mostraron que las rubredoxinas pueden dividirse en dos grupos: un grupo relacionado a AlkG1 y otro relacionado a AlkG2. Sólo las rubredoxinas del grupo AlkG2 fueron capaces de restablecer el crecimiento con *n*-octano de una cepa de *Escherichia coli* recombinante sin una rubredoxina activa (van Beilen, Neuenschwander et al. 2002). Por otro lado, los sistemas rubredoxina-rubredoxina reductasa están presentes en muchos microorganismos que no degradan alcanos, donde sirven otras funciones (Rojo 2010).

Si bien no se ha determinado la estructura cristalizada de AlkB, se ha deducido que tiene seis segmentos transmembrana (van Beilen, Penninga et al. 1992), y un centro activo con dos átomos de hierro (Shanklin, Achim et al. 1997). Asimismo, en su secuencia hay ocho residuos de histidina que son esenciales para su actividad enzimática (Shanklin and Whittle 2003). Estos residuos de histidina se encuentran formando parte de tres motivos conservados no sólo en las alcano monooxigenasas, sino también en otras enzimas oxidativas de membrana con un centro de hierro como las ácido graso desaturasas (eucariotas) y la xileno monooxigenasa de *Pseudomonas putida* (Shanklin, Whittle et al. 1994). Asimismo, hay un cuarto motivo de histidina exclusivo de las alcano monooxigenasas [NYXEHYG(L/M)] (Smits, Röthlisberger et al. 1999), cuya histidina también es esencial para la actividad enzimática (van Beilen, Smits et al. 2005). Se supone que los cuatro motivos conservados de histidina estarían actuando como quelantes de los dos átomos de hierro involucrados en el centro activo (Shanklin and Whittle 2003; van Beilen, Smits et al. 2005). La enzima AlkB de *Pseudomonas putida* puede oxidar propano, *n*-butano (Johnson and Hyman 2006), y alcanos C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub> (van Beilen, Smits et al. 2005), otorgando la capacidad de crecimiento en presencia de estos compuestos. Sin embargo esta enzima no presenta la capacidad de oxidar metano, etano o alcanos de longitud mayor a 13 carbonos. En un estudio de mutagénesis dirigida, se identificó que el residuo de Triptofano en la posición 55 (AlkB *Pseudomonas putida*) o 58 (AlkB1 *Alcanivorax borkumensis*) determina la

longitud máxima del alcano hidroxilado (van Beilen, Smits et al. 2005). Se han identificado homólogos a AlkB de *Pseudomonas putida*, tanto en organismos Gram-positivos como Gram-negativos, mostrando una gran diversidad al nivel de las secuencias (Smits, Röthlisberger et al. 1999; Marin, Smits et al. 2001; Smits, Balada et al. ; van Beilen, Smits et al. ; Marin, Yuste et al. ; van Beilen, Z. et al. ; van Beilen, Marin et al.).

#### 2.2.2.4 Monooxigenasas citocromo P450

Las monooxigenasas tipo citocromo P450 son hemoproteínas que catalizan la oxigenación de una gran variedad de compuestos como ser ácidos grasos, terpenos, esteroides, prostaglandinas, compuestos poliaromáticos, como también la oxigenación de numerosas drogas, solventes orgánicos, antibióticos, pesticidas, carcinógenos, y toxinas (Urlacher and Girhard 2012). Se encuentran distribuidas en los tres dominios filogenéticos (archaea, bacteria, eukarya). La mayoría de los citocromos P450 eucariotas son enzimas unidas a membrana, mientras que los citocromos P450 procariotas son solubles (Maier, Forster et al. 2001). Varias cepas bacterianas capaces de degradar alcanos de cadena media ( $C_5$ - $C_{10}$ ) contienen monooxigenasas solubles pertenecientes a una clase particular de la superfamilia P450, denominada clase CYP153, cuya primera enzima fue caracterizada en *Acinetobacter* sp. EB104 (Maier, Forster et al. 2001). Se han encontrado enzimas de esta clase en cepas de los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Alcanivorax* (Funhoff, Bauer et al. 2006; van Beilen, Funhoff et al. 2006; Liu, Wang et al. 2011; Wang and Shao 2012). La transferencia de electrones esta mediada por una ferredoxina reductasa que contiene FAD y acepta los electrones desde el NADH, y una ferredoxina, que contiene hierro-azufre y transfiere los electrones a la monooxigenasa P450 (van Beilen, Z. et al. 2003).

#### 2.2.2.5 Alcano hidroxilasas para alcanos de cadena larga

El crecimiento en presencia de alcanos de longitud mayor a  $C_{16}$  se ha reportado para diferentes cepas tanto Gram-positivas (*Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Dietzia*, *Geobacillus*) como Gram-negativas (*Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*) (Wentzel, Ellingsen et al. 2007), y en algunos casos se han caracterizado las enzimas responsables. Por ejemplo, *Acinetobacter* sp. M1, capaz de crecer en presencia de alcanos  $C_{13}$ - $C_{44}$  (Sakai, Maeng et al. 1994), posee al menos tres enzimas para oxidar alcanos. La primera enzima caracterizada es una dioxigenasa soluble que requiere FAD y  $Cu^{2+}$  para su actividad frente a alcanos  $C_{10}$  a  $C_{30}$  (Maeng, Sakai et al. 1996). Posteriormente, se identificaron las enzimas AlkM, relacionadas a la

familia AlkB, tanto en *Acinetobacter* sp. M1 (AlkMa y AlkMb) (Tani, Ishige et al. 2001), como en *Acinetobacter calcoaceticus* EB104 (Smits, Röthlisberger et al. 1999), *Acinetobacter* sp. ADP1 (Ratajczak, Geissdorfer et al. 1998), y *Acinetobacter* sp. DSM 17874 (Throne-Holst, Markussen et al. 2006). Asimismo, en este último microorganismo, se identificó un gen novedoso (*almA*), que codifica para una monooxigenasa de unión a FAD (putativa) involucrada en la utilización de alcanos  $C_{32}$  y  $C_{36}$  (Throne-Holst, Wentzel et al. 2007). En el mismo trabajo, se identificaron genes homólogos a *almA* en otras dos cepas de *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. RAG-1 y *Acinetobacter* sp. M-1) (Throne-Holst, Wentzel et al. 2007). Los genes *almA* también fueron estudiados en dos cepas de *Alcanivorax*, *A. hongdengensis* A-11-3 y *A. dieselolei* B-5, donde se observó que su expresión es inducida por la presencia de alcanos de cadena larga ( $> C_{18}$ ) (Liu, Wang et al. 2011; Wang and Shao 2012). Recientemente, se observó que los genes *almA* se encontraban ampliamente distribuidos en bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos de cadena larga, como ser *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Acinetobacter*, *Salinisphaera* y *Parvibaculum* (Wang and Shao 2012).

Otra clase de monooxigenasa, denominada LadA, fue aislada de la bacteria termófila *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, es de localización extracelular y realiza la oxidación terminal de alcanos  $C_{15}$ - $C_{36}$  (Feng, Wang et al. 2007). El análisis de su estructura cristalizada permitió su clasificación dentro de la familia de luciferasas bacterianas, las cuales son oxigenasas de dos componentes dependientes de FAD (Li, Liu et al. 2008).

### 2.2.3 ORGANIZACIÓN GÉNICA Y MECANISMOS DE REGULACIÓN

Frecuentemente, las bacterias degradadoras de alcanos poseen múltiples genes divergentes para la oxidación de estos compuestos. Las enzimas en algunos casos se diferencian en el rango de los sustratos utilizados, aunque pueden ocurrir superposiciones, o ser activados en diferentes fases del crecimiento. La presencia de un regulador específico da como consecuencia que los genes de la vía sólo se expresen en presencia del compuesto que va a ser asimilado. Asimismo, superpuestos a los mecanismos de regulación específica, actúan mecanismos de regulación globales, de manera que estas vías sólo se inducen en las condiciones fisiológicas o ambientales adecuadas. Por ejemplo, cuando las células se enfrentan a una mezcla de compuestos potencialmente asimilables, el mecanismo de control denominado represión por catabolito determina la asimilación jerárquica de las fuentes de carbono disponibles (Rojo 2010).

Los genes para la degradación de alcanos pueden estar organizados en operones, o encontrarse separados a lo largo del genoma (Figura 2.3), lo cual ha dificultado el estudio de los

reguladores específicos. La Tabla 2.1 contiene algunos ejemplos de reguladores estudiados (Wang and Shao 2013). A continuación, se describirá la organización genética y los mecanismos de regulación estudiados en *Pseudomonas putida*, que posee un metabolismo versátil capaz de crecer en presencia de diferentes fuentes de carbono, entre las cuales los alcanos no son sustratos preferenciales; y en *Alcanivorax borkumensis*, que como veremos más adelante, utiliza casi exclusivamente alcanos como fuente de carbono y energía.

**Tabla 2.1. Ejemplos de reguladores transcripcionales estudiados o que se presume que controlan la expresión de rutas degradativas de alcanos.**

| Bacteria                                | Gen          | Familia                      | Efector   | Evidencia              | Referencia   |
|---|--------------|------------------------------|---|------------------------|--|
| <i>Pseudomonas putida</i> GPo1          | <i>alkS</i>  | LuxR/MalT                    | <i>n</i> -alcanos C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub>     | Directa                | (Sticher, Jaspers et al. 1997; Panke, Meyer et al. 1999) |
| <i>Pseudomonas butanovora</i>           | <i>bmoR</i>  | Dependiente de $\delta^{54}$ | Alcoholes alifáticos C <sub>2</sub> -C <sub>8</sub>   | Directa                | (Kurth, Doughty et al. 2008)                             |
| <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2      | <i>alkS</i>  | LuxR/MalT                    | Sin estudios  | Similitud de secuencia | (Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006)              |
| <i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3 | <i>tetR</i>  | TetR                         | Sin estudios  | Similitud de secuencia | (Wang and Shao)  |
| <i>Acinetobacter</i> sp. M1             | <i>alkRa</i> | AraC/XylS                    | Alcoholes alifáticos > C <sub>22</sub>                | Indirecta              | (Tani, Ishige et al. 2001)                               |
| <i>Acinetobacter</i> sp. M1             | <i>alkRb</i> | OruR                         | Alcoholes alifáticos C <sub>16</sub> -C <sub>22</sub> | Indirecta              | (Tani, Ishige et al. 2001)                               |
| <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1           | <i>alkR</i>  | AraC/XylS                    | Alcoholes alifáticos C <sub>7</sub> -C <sub>18</sub>  | Directa                | (Ratajczak, Geissdorfer et al. 1998)                     |

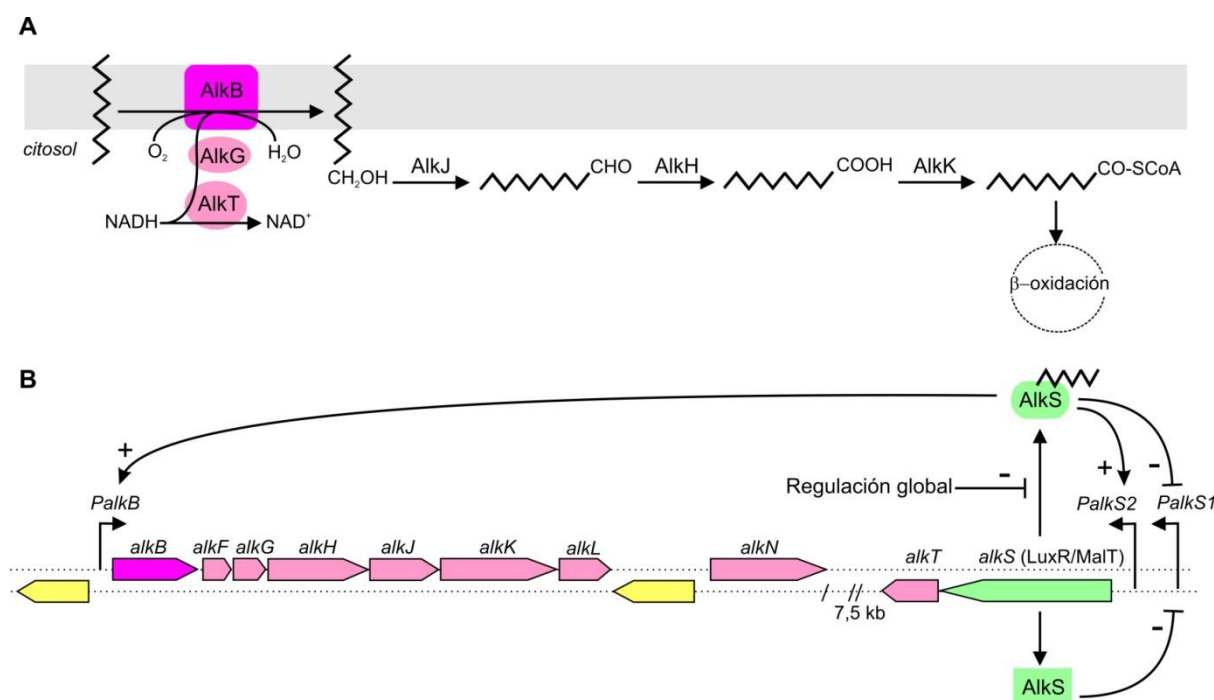
### 2.2.3.1 *Pseudomonas putida*

Los genes de la vía de degradación de alcanos de *Pseudomonas putida* GPo1 se encuentran formando dos operones en el plásmido OCT: *alkBFGHJKL* y *alkST*. Como se mencionó anteriormente, la primer enzima de la vía es una alcano hidroxilasa de tres componentes: AlkB (monooxigenasa), AlkG (rubredoxina), y AlkT (rubredoxina reductasa). El operón *alkBFGHJKL*

codifica para dos de los tres componentes de la alcano hidroxilasa (AlkB y AlkG), y para las enzimas involucradas en las reacciones subsiguientes: AlkJ (alcohol deshidrogenasa), AlkH (aldehído deshidrogenasa), y AlkK (acyl-CoA-sintetasa). El operón *alkST* codifica para el regulador transcripcional AlkS (que pertenece a la familia de reguladores LuxR (Panke, Meyer et al. 1999)), y la rubredoxina reductasa AlkT (Figura 2.2) (van Beilen, Wubbolts et al. 1994). El operón *alkBFGHJKL* se transcribe a partir del promotor *PalkB*, cuya expresión requiere el regulador transcripcional AlkS y la presencia de alcanos (Grund, Shapiro et al. 1975; Eggink, Engel et al. 1988; Kok, Oldenhuis et al. 1989). A su vez, la proteína AlkS regula la expresión de su propio gen tanto de manera negativo como positiva. En ausencia de alcanos, *alkS* se expresa a partir del promotor *PalkS1*, el cual es reconocido por la ARN polimerasa unida al factor sigma alternativo  $\sigma^S$ , y cuya actividad es muy baja en la fase exponencial de crecimiento y aumenta en la fase estacionaria (Canosa, Yuste et al. 1999). El factor  $\sigma^S$  dirige la expresión de genes inducidos en fase estacionaria o en condiciones de estrés (Loewen and Hengge-Aronis 1994). El promotor *PalkS1* es regulado negativamente por la unión de AlkS, limitando la expresión de *alkS* en la fase estacionaria. En presencia de alcanos, AlkS reprime más eficientemente a *PalkS1*, a la vez que activa un segundo promotor, denominado *PalkS2*, localizado 38 nt corriente abajo de *PalkS1*. La activación de *PalkS2* permite la expresión eficiente de *alkS* (Figura 2.2 B). En resumen, la expresión de *alkS* está regulada por un mecanismo de retroalimentación positiva, produciéndose un aumento rápido de la transcripción de *alkS* en presencia de alcanos. Este mecanismo permite una inducción rápida de la vía de degradación, como así también una terminación rápida cuando los alcanos se agotan (Canosa, Sanchez-Romero et al. 2000).

Asimismo, la expresión de los promotores *PalkB* y *PalkS2* se encuentra reprimida cuando las células crecen en un medio rico como LB o en presencia de fuentes de carbono alternativas, como ser ácidos orgánicos (Yuste, Canosa et al. 1998; Staijen, Marcionelli et al. 1999; Canosa, Sanchez-Romero et al. 2000). Cuando las células crecen en medio rico, el control negativo depende del efecto aditivo de dos redes de regulación globales (Figura 2.2 B) (Dinamarca, Aranda-Olmedo et al. 2003). Una de ellas involucra a la proteína reguladora global Crc (catabolite repression control) (Yuste and Rojo 2001), mientras que la otra involucra a un componente de la cadena de transporte de electrones, la citocromo o ubiquinol oxidasa (Cyo) (Dinamarca, Aranda-Olmedo et al. 2003). Crc es una proteína de unión a ARN que al unirse a los ARNm de *alkS* y *alkB* inhibe su traducción (Moreno, Marzi et al. 2009; Hernandez-Arranz, Moreno et al. 2013). Asimismo, Crc también es capaz de unirse a los ARNm de *alkG* y *alkH* (Hernandez-Arranz, Moreno et al. 2013). El mecanismo mediante el cual Cyo reprime la expresión de la vía de degradación de alcanos aún no se ha dilucidado. La inactivación de Cyo

afecta la expresión de muchos otros genes además de los de la vía de degradación *alk*, por lo que se ha propuesto que Cyo participa en el control global de la expresión génica al coordinar el metabolismo de compuestos de carbono con la actividad de la cadena de transporte de electrones (Petruschka, Burchhardt et al. 2001; Morales, Ugidos et al. 2006).

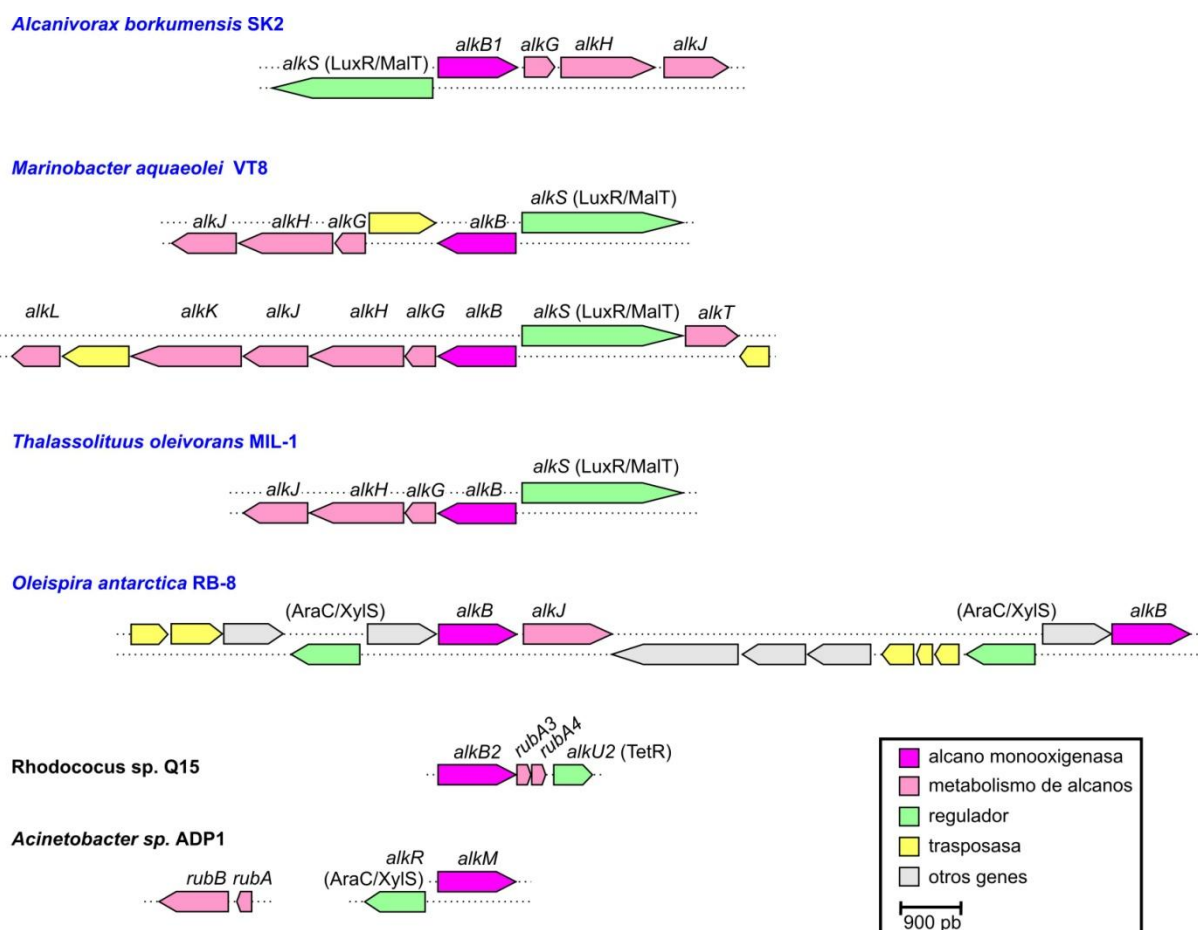


**Figura 2.2. A. Vía *alk* de oxidación de alkanos de cadena media en *Pseudomonas putida* GPo1.** La primer enzima de la vía, Alcano hidroxilasa, está formada por las subunidades AlkB (Alcano monooxigenasa), AlkG (Rubredoxina), y AlkT (Rubredoxina reductasa). Las siguientes enzimas involucradas son: AlkJ (Alcohol deshidrogenasa), AlkH (Aldehído deshidrogenasa), y AlkK (Acil-CoA sintetasa) que activa a los ácidos grasos generados para su entrada en el ciclo de  $\beta$ -oxidación. B. Regulación en *Pseudomonas putida* GPo1. La expresión de la ruta está controlada por el regulador AlkS. En ausencia de alkanos, se producen niveles muy bajos de AlkS a partir del promotor PalkS1 dependiente del factor  $\sigma$ . En la fase estacionaria, la actividad de PalkS1 aumenta, pero la transcripción se mantiene baja debido al efecto inhibitorio de AlkS. En ausencia de alkanos, el promotor PalkS2 permanece inactivo. Cuando los alkanos entran a la célula, AlkS activa a los promotores PalkB y PalkS2, mientras que continua la represión de PalkS1. A su vez, existen mecanismos de regulación global que actúan en presencia de una fuente de carbono preferencial, impidiendo la activación de la vía mediada por AlkS (figura adaptada de (van Beilen, Wubbolts et al. 1994; Canosa, Sanchez-Romero et al. 2000)). El gen codificante para la subunidad Alcano monooxigenasa se muestra en fucsia, el resto de los genes codificantes para enzimas de la vía *alk* se muestran en rosa. El gen codificante para el regulador se indica en verde, y la familia a la cual pertenecen se indica entre paréntesis. Los genes que corresponden a transposasas se muestran en amarillo.

### 2.2.3.2 *Alcanivorax borkumensis*

*Alcanivorax borkumensis* es una Gammaproteobacteria marina cosmopolita, oligotrófica, especializada en la degradación de un amplio rango de alcanos (*n*-alcanos hasta C<sub>32</sub>, alcanos ramificados, alquilcicloalcanos, isoprenoides como fitano y pristano), pero incapaz de crecer en la mayoría de los sustratos comunes como azúcares y aminoácidos (Yakimov, Golyshin et al. 1998; Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006). Posee dos enzimas de la familia AlkB involucradas en la oxidación de alcanos C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> divergentes entre sí (AlkB1 y AlkB2). Los genes *alkB1* y *alkB2* son inducidos en la fase exponencial de crecimiento cuando las células crecen en presencia de alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> (Hara, Baik et al. 2004; van Beilen, Marin et al. 2004), y su expresión disminuye en la fase estacionaria (van Beilen, Marin et al. 2004; Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006). AlkB1 está relacionada filogenéticamente con AlkB de *Pseudomonas putida* GPo1, mientras que AlkB2 se encuentra relacionada con las dos alcano monooxigenasas de localización cromosomal de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. La organización genética de la región correspondiente a *alkB1* (*alkSB<sub>1</sub>GJH*) es similar a la encontrada en *Pseudomonas putida* (Figura 2.3), y además, las proteínas codificadas por este operón (a excepción de AlkS) presentan más del 80% de similitud a nivel de aminoácidos con las proteínas correspondientes de *Pseudomonas putida* (van Beilen, Marin et al. 2004). En un estudio proteómico, se determinó que las proteínas AlkB1, AlkG, AlkH, AlkJ, y AlkS de *Alcanivorax borkumensis* SK2 se encontraban asociadas a la fracción de membrana y se expresaban diferencialmente en presencia de hexadecano (Sabirova, Ferrer et al. 2006).

El gen que codifica para AlkS se encuentra corriente arriba y en orientación opuesta del operón *alkB1GHJ* (Figura 2.3). Las proteínas AlkS de *Alcanivorax borkumensis* AP1 y *Alcanivorax borkumensis* SK2 presentan 30% y 48% de identidad al nivel de la secuencia de aminoácidos con AlkS de *Pseudomonas putida* GPo1, respectivamente (van Beilen, Marin et al. 2004; Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006). Corriente arriba del gen *alkB1* de *Alcanivorax borkumensis* AP1 se encuentra una secuencia de repetición invertida similar al sitio de unión de AlkS en *Pseudomonas putida* Gpo1; y se observó que AlkS de *Pseudomonas putida* Gpo1 es capaz de activar la expresión del gen *alkB1* de *Alcanivorax borkumensis* AP1 en presencia de octano (van Beilen, Marin et al. 2004).



**Figura 2.3. Organización de genes *alk* en diferentes microorganismos.** Los nombres de las bacterias degradadoras de origen marino se muestran en azul. Los genes unidos por una línea de puntos se encuentran contiguos en la secuencia. Si los genes no están unidos por una línea, se localizan en otra parte del genoma. Referencias: *alkB*, *alkM*, alcano monooxigenasa; *alkF*, rubredoxina-1; *alkG*, *rubA*, rubredoxina-2; *alkH*, aldehído deshidrogenasa; *alkJ*, alcohol deshidrogenasa; *alkK*, acyl-CoA sintetasa; *alkL*, proteína de la familia OmpW; *alkN*, receptor quimiotaxis; *alkT*, *rubB*, rubredoxina reductasa; *alkS*, *alkR*, *alkU*, reguladores de las familias LuxR/MalT, AraC/XylS, y TetR, respectivamente.

## 2.2.4 EVOLUCIÓN MOLECULAR Y TRANSFERENCIA HORIZONTAL

En varios microorganismos degradadores de alcanos, el grupo de genes *alk* se caracteriza por poseer un contenido de G+C menor que el del resto del genoma, y/o por estar flanqueados por secuencias involucradas en eventos de transposición de ADN. Tal es el caso por ejemplo de *Pseudomonas putida* Gpo1 y P1 (van Beilen, Panke et al. 2001), *Oceanicaulis alexandrii*, *Alcanivorax borkumensis*, y *Marinobacter aquaeolei* (Yakimov, Timmis et al. 2007). Esto ocurre frecuentemente en los genes catabólicos, y se han descrito muchos transposones catabólicos (Tan 1999; van Beilen, Panke et al. 2001). Mediante un estudio genómico comparativo se observó que la región *alk* de *Pseudomonas putida* exhibe el patrón de uso de tetranucleótidos típico del genoma de *Alcanivorax borkumensis*. A su vez, el análisis de las regiones *alkB1* y



*alkB2* de *Alcanivorax borkumensis* SK2 sugirió que este grupo de genes fue adquirido a partir de un ancestro del linaje *Yersinia* (Reva, Hallin et al. 2008). Los autores concluyen que la transferencia horizontal fue relevante para conferirle a *Alcanivorax borkumensis* su rasgo metabólico probablemente más importante, pero aparentemente, el hábitat estable de agua de mar no favoreció la mezcla y el intercambio de genes con otros taxa. En su lugar, evolucionó un cromosoma simétrico y estructuralmente homogéneo, que carece de numerosos rasgos metabólicos (Yakimov, Golyshin et al. 1998; Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006) encontrados en *Pseudomonas*, sus parientes versátiles que poseen un cromosoma de un tamaño dos veces mayor (Stover, Pham et al. 2000; Nelson, Weinelt et al. 2002; Reva, Hallin et al. 2008).

### 2.2.5 BIODEGRADACIÓN EN EL AMBIENTE MARINO

Las bacterias en el medio ambiente no se encuentran aisladas sino todo lo contrario, forman comunidades microbianas. Las comunidades se definen como ensambles de múltiples especies que ocupan un área dada al mismo tiempo, e interactúan entre sí y con el medio ambiente (Little, Robinson et al. 2008; Konopka 2009). Existen diferentes tipos de interacciones que pueden influir sobre los procesos de degradación de manera positiva o negativa. Por ejemplo, la producción de biosurfactantes, ya sea por microorganismos degradadoras o no, promueve los procesos degradativos al aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos poco solubles o adsorbidos. Asimismo, la presencia de protozoos se ha asociado tanto al aumento como a la disminución de las velocidades de biodegradación (Head, Jones et al. 2006; McGenity, Folwell et al. 2012).

#### 2.2.5.1 Bacterias marinas degradadoras

En el ambiente marino se desarrolló un grupo de bacterias globalmente distribuidas que utilizan casi exclusivamente hidrocarburos como fuente de carbono, por lo que se denominan bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas (OHCB). Normalmente se encuentran en niveles bajos o no detectables en ambientes marinos no contaminados, y aumentan luego de la introducción de petróleo o de sus constituyentes en el agua de mar. Las OHCB pertenecen principalmente a la clase Gammaproteobacteria, a los géneros *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus*, y *Oleispira*. Presentan adaptaciones específicas para la degradación de hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos, por lo que también se las denomina degradadoras “especialistas” o “profesionales” (Golyshin, Martins Dos Santos et al. 2003; Harayama, Kasai et al. 2004; Yakimov, Timmis et al. 2007). Por ejemplo, el análisis del

genoma de *Alcanivorax borkumensis* SK2 reveló que posee múltiples sistemas enzimáticos para la degradación de un amplio rango de alcanos (dos alcano hidroxilasas de la familia AlkB y tres de la familia citocromo P450) (Sabirova, Ferrer et al. 2006), acompañados de la producción de biosurfactante (Yakimov, Golyshin et al. 1998) y la formación de biofilm en la interfase agua-hidrocarburo lo cual facilita el acceso a los mismos. Asimismo, contiene múltiples sistemas de transporte para nutrientes minerales (Nitrógeno, Fósforo, Azufre) y oligoelementos (Molibdeno, Zinc, Magnesio, Cobalto), que compensan el desbalance carbono/nutrientes que se produce luego de un aumento de la fuente de carbono como puede ser un derrame de hidrocarburos. Por último, presenta sistemas de respuesta a varios factores de estrés relacionados al hábitat marino, como ser las radiaciones ultravioleta y bajas temperaturas (Schneiker, Martins dos Santos et al. 2006; Sabirova, Chernikova et al. 2008).

Si bien las bacterias del grupo OHCB han sido muy estudiadas y se consideran importantes globalmente en la remoción de hidrocarburos en ambientes marinos (Head, Jones et al. 2006), se han identificado muchas otras bacterias marinas degradadoras no obligadas (Prince, Gramain et al. 2010). Entre las Gammaproteobacterias podemos nombrar a los géneros *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Halomonas*. También se han descripto bacterias marinas pertenecientes a las clases Alphaproteobacteria y Actinobacteria, por ejemplo los géneros *Erythrobacter*, *Maribius*, *Tranquillimonas*, *Jannaschia* (Alphaproteobacteria), y *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Nocardioidea* (Actinobacteria) (Harwati, Kasai et al. 2007; Kämpfer 2010; Kim and Kwon 2010).

### 2.2.5.2 Biodegradación en zonas frías

La temperatura afecta las velocidades de degradación bacterianas y las propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos, como la viscosidad, difusión y volatilización, produciendo cambios en la composición del petróleo, y en la biodisponibilidad de los componentes del mismo. No obstante, se han aislado bacterias degradadoras de hidrocarburos autóctonas de ambientes polares (agua de mar y hielo marino). Pertenecen mayoritariamente a las clases Gammaproteobacteria (por ejemplo, los géneros *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Oleispira*, y *Shewanella*), Alphaproteobacteria (*Sphingomonas*), y también se han aislado bacterias del filo Actinobacteria (géneros *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, y *Agreia*) (Brakstad 2008; Lo Giudice, Bruni et al. 2010). Por otro lado, en estudios independientes del cultivo – microcosmos con agua de mar y petróleo crudo – Coulon y colaboradores observaron biodegradación a 4 °C, asociada a una dominancia de clones

relacionados a un psicrofílo especialista (*Oleispira*), junto con otros clones relacionados a bacterias tolerantes al frío, incluyendo bacterias hidrocarbonoclásticas conocidas como *Thalassolituus* y *Cycloclasticus*, así como también *Roseobacter* (familia Rhodobacteraceae, clase Alphaproteobacteria) (Coulon, McKew et al. 2007). Los clones relacionados a la familia Rhodobacteraceae (*Roseobacter* y *Sulfitobacter*) fueron dominantes en otros estudios independientes del cultivo con agua de mar y petróleo crudo (Brakstad and Lodeng 2005; Prabakaran, Manorama et al. 2007).

## 2.3 EL ESTUDIO DE MICROORGANISMOS AMBIENTALES MEDIANTE TÉCNICAS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

La mayor parte de la diversidad microbiana del planeta no puede ser cultivada en el laboratorio (Amann, Ludwig et al. 1995; Rappé and Giovannoni 2003). Por un lado, a fin de mejorar el porcentaje de microorganismos recuperados del medio ambiente, en la última década los microbiólogos han introducido una serie de innovaciones para imitar mejor las condiciones naturales de crecimiento. Esto dio lugar a un aumento significativo de la recuperación microbiana. Sin embargo, aún no se comprenden del todo las razones por las que los microorganismos ambientales no crecen en medios artificiales (Epstein 2013). Algunas explicaciones son discutidas por Epstein (Epstein 2013) y en otras referencias dentro de ese trabajo.

Por otro lado, también se impulsó el desarrollo de una serie de técnicas moleculares independientes del cultivo, con el fin de estudiar en profundidad las comunidades microbianas ambientales sin tener que pasar por una etapa de cultivo en el laboratorio. Estas técnicas comienzan con el procesamiento de la muestra ambiental en estudio, realizando un paso de extracción de sus biomoléculas. Lo más frecuente es extraer el ADN metagenómico, es decir, el conjunto de todos los genomas contenidos en la muestra (metagenoma). Este paso es el más crucial, ya que se debe obtener suficiente cantidad de ADN de alta calidad, y debe ser representativo de todas las células presentes en la muestra, por lo cual se ponen a punto protocolos adecuados al tipo de muestra. Por ejemplo, si la comunidad en estudio está asociada con un hospedador, sería recomendable realizar un fraccionamiento o lisis selectiva para minimizar la extracción del ADN del hospedador (Thomas, Gilbert et al. 2012). A grandes rasgos, se distinguen dos estrategias de extracción de ADN: la extracción directa donde la lisis se realiza directamente a partir de la muestra (Ogram, Sayler et al. 1987; Tsai and Olson 1991); o la extracción indirecta donde las células primero se separan de la muestra y luego se realiza el paso

de lisis (Jacobsen and Rasmussen 1992). Con el método indirecto, hasta cierto punto se pueden separar las células procariotas de las eucariotas (utilizando un gradiente de densidad) (Courtois, Frostegard et al. 2001), se evita la co-extracción de inhibidores enzimáticos (tales como los ácidos húmicos), aunque el procedimiento lleva más tiempo. Por otro lado, con el método directo se obtiene un mayor rendimiento (en términos de masa de ADN por masa de suelo), aunque con una pureza menor (Steffan, Goksoyr et al. 1988; Leff, Dana et al. 1995). Asimismo, se han observado algunas diferencias significativas en cuanto a las especies bacterianas y las funciones identificadas al comparar ambos métodos de extracción (Delmont, Robe et al. 2011).

### **2.3.1 ESTRATEGIAS BASADAS EN EL ESTUDIO DE UNA FAMILIA DE GENES**

#### **2.3.1.1 Genes marcadores filogenéticos y funcionales**

Los genes marcadores filogenéticos permiten obtener información de la identidad de los microorganismos que integran una comunidad microbiana. Los marcadores filogenéticos más estudiados y utilizados corresponden a los genes codificantes para los ARN ribosomales (ARNr), en particular el ARNr 16S, y en menor medida, el ARNr 23S. Las secuencias de los ARNr alternan regiones de conservación variable, desde regiones conservadas (que evolucionan lentamente) a hipervariables (que evolucionan rápidamente), lo cual permite obtener información sobre distintos niveles de resolución filogenética (Ludwig, Strunk et al. 1998). Por ejemplo, el gen ARNr 16S contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que permiten la identificación al nivel de género o en algunos casos a nivel de especie (Gutell, Larsen et al. 1994; Van de Peer, Chapelle et al. 1996).

Los genes marcadores funcionales corresponden a los genes codificantes para proteínas, y permiten obtener información sobre el potencial metabólico de una comunidad microbiana, ya sea sobre una ruta metabólica particular (Powell, Ferguson et al. 2006), varios procesos relacionados (Rhee, Liu et al. 2004), o sobre el perfil completo de proteínas de una muestra ambiental (Tringe, von Mering et al. 2005).

#### **2.3.1.2 Construcción de bibliotecas de productos de amplificación**

Los genes marcadores de interés pueden ser amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una muestra ambiental en estudio, utilizando cebadores especialmente diseñados. Se obtiene una mezcla de fragmentos diferentes del mismo gen, que se originaron a partir de las diferentes miembros de la comunidad microbiana. Los fragmentos son clonados y secuenciados para su análisis (Abed 2009). El uso de bibliotecas del gen ARNr 16S

permitió avances importantes en la identificación de nuevos grupos bacterianos, como el género *Pelagibacter* (previamente denominado clado SAR11) que representa más de un tercio de las células procariotas en la superficie del océano (Giovannoni, Britschgi et al. 1990; Morris, Rappe et al. 2002), arqueas en ambientes marinos (DeLong 1992; DeLong, Wu et al.), y permitió reconocer la abundancia de miembros del filo *Acidobacteria* en el suelo (Kuske, Barns et al. 1997). Esta técnica también se ha utilizado para estudiar los cambios en las comunidades microbianas en experimentos de biorremediación (Ogino, Koshikawa et al. 2001; Röling, Milner et al. 2002). La diversidad de genes involucrados en la biodegradación de hidrocarburos también ha sido estudiada con esta estrategia, por ejemplo, dioxigenasas de hidrocarburos aromáticos (Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Marcos, Lozada et al. 2009) y oxigenasas de hidrocarburos alifáticos (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009), permitiendo la identificación de nuevas variantes asociadas a microorganismos no cultivados hasta el momento.

Las limitaciones de esta técnica son aquellas derivadas de la reacción de PCR y del paso de clonado (Palatinszky, Nikolausz et al. 2011). Por ejemplo, el diseño de los cebadores depende de la información presente en las bases de datos de secuencias, por lo tanto, a medida que aumentan las secuencias conocidas, se deberá re-evaluar la especificidad y utilidad de los cebadores desarrollados previamente con un conjunto de datos menor. Asimismo, es evidente que será difícil desarrollar cebadores universales (complementarios a todos los genes ARNr 16S del dominio Bacteria, por ejemplo) para los grupos poco representados o directamente inexistentes en las bases de datos (Baker, Smith et al. 2003; Forney, Zhou et al. 2004). En segundo lugar, esta técnica no permite cuantificar las abundancias relativas de las distintas variantes génicas presentes en la muestra, debido a los desvíos que presentan la PCR multitemplado (Suzuki and Giovannoni 1996).

### 2.3.1.3 Secuenciación en gran escala

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (*High Throughput Sequencing Technologies*, o *Next Generation Sequencing*) marcó un salto en el estudio de los microorganismos ambientales, ya que permiten el procesamiento de varias muestras en paralelo, y generan grandes cantidades de secuencias por muestra (Tabla 2.2). Esto permitió estudiar las comunidades microbianas con mayor resolución y la secuenciación de genomas completos en menos tiempo respecto a los métodos anteriores (Di Bella, Bao et al. 2013). En la Tabla 2.2 se resumen las características principales de dos plataformas comerciales ampliamente utilizadas: Roche 454 (<http://www.454.com/>), e Illumina (<http://www.illumina.com/>). Dado que se obtienen

lecturas (secuencias) largas, el sistema de Roche 454 es útil para resolver secuencias repetitivas o palindrómicas, como así también en análisis metagenómicos basados en las lecturas sin ensamblar (sección 2.3.2.2) (Luo, Tsementzi et al. 2012). Los tipos de errores más comunes son las inserciones y las deleciones en las regiones homopoliméricas (repeticiones de un mismo nucleótido), debido a la manera en que se detecta la incorporación de nucleótidos durante la secuenciación. Por otro lado, la plataforma de Illumina genera la mayor cantidad de información por corrida, a un menor costo de reactivos. Las desventajas son que se obtienen lecturas cortas y los tiempos de corrida pueden ser más largos (Tabla 2.2) (Di Bella, Bao et al. 2013).

**Tabla 2.2. Características principales de las plataformas comerciales Roche 454 e Illumina.**

| Plataformas                                   | Roche 454 GS FLX Titanium   |           | Illumina HiSeq 2500            |                           |
|---|---|-----------|--------------------------------|---------------------------|
|   | XLR70   | XL+       | Corrida rápida                 | Alto rendimiento          |
| <b>Tecnología</b>                             | Pirosecuenciación   |           | Terminación reversible cíclica |                           |
| <b>Información generada por corrida</b>       | 450 Mb  | 700 Mb    | 10-180 Gb                      | 50-1000 Gb                |
| <b>Tiempo de corrida</b>                      | 10 horas  | 23 horas  | 7-40 horas                     | 1 día - 6 días            |
| <b>Longitud de las lecturas<sup>(1)</sup></b> | 600 pb  | 1000 pb   | 2 x 150 pb <sup>(2)</sup>      | 2 x 125 pb <sup>(2)</sup> |
| <b>Lecturas por corrida</b>                   | ~1 millón: <i>shotgun</i> <sup>(3)</sup><br>~700.000: <i>amplicones</i> | ~1 millón | 300 millones <sup>(4)</sup>    | 2 billones <sup>(4)</sup> |

<sup>(1)</sup> longitud máxima

<sup>(2)</sup> los fragmentos son secuenciados desde ambos extremos (*paired-reads*)

<sup>(3)</sup> secuenciación al azar del metagenoma

<sup>(4)</sup> por placa de secuenciación, se pueden procesar una o dos placas por corrida

Una de las aplicaciones de estas tecnologías es la secuenciación en gran escala de genes marcadores (filogenéticos o funcionales), previa amplificación por PCR (generación de los *amplicones*) y sin realizar un paso de clonado. Dado la gran cantidad de secuencias generadas, las mismas son procesados a través de paquetes de software especializados, siendo *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (Caporaso, Kuczynski et al. 2010) y *mothur* (Schloss, Westcott et al. 2009) dos de los más utilizados.

### 2.3.2 METAGENÓMICA: TÉCNICAS BASADAS EN EL ESTUDIO CONJUNTO DEL METAGENOMA

La metagenómica se basa en el estudio del conjunto de la información genómica de (teóricamente) todos los microorganismos de una muestra ambiental (el metagenoma) (Handelsman, Rondon et al. 1998; Riesenfeld, Schloss et al. 2004). Comenzó con el objetivo de clonar directamente el ADN extraído de una muestra ambiental (Handelsman, Rondon et al. 1998), y continuó avanzando con la secuenciación directa de ese ADN sin un paso de clonado (Tyson, Chapman et al. 2004; Venter, Remington et al. 2004; Thomas, Gilbert et al. 2012). A continuación, se describirán dos estrategias metagenómicas: la construcción de bibliotecas metagenómicas y la secuenciación al azar del metagenoma.

#### 2.3.2.1 Bibliotecas metagenómicas

La construcción de este tipo de bibliotecas involucra los mismos pasos utilizados durante el clonado del ADN genómico de un microorganismo individual, es decir, fragmentación del ADN, inserción en un vector adecuado, y transformación de los vectores recombinantes en un hospedador adecuado. Según el tamaño promedio del inserto, los vectores utilizados pueden ser plásmidos (menos de 15 kb), cósmidos y fósidos (hasta 40 kb), o BACs (Bacterial Artificial Chromosomes, más de 40 kb). Las bibliotecas metagenómicas construidas en plásmidos son adecuadas para la identificación de genes individuales u operones pequeños, mientras que las bibliotecas construidas en los vectores de mayor capacidad son preferibles para la identificación de grupos de genes más grandes, como ser una vía metabólica compleja (Daniel 2005). Además, los vectores del tipo BAC y fósidos, al estar presentes en una sola copia en la célula huésped, no presentan los problemas de inestabilidad del ADN clonado característicos de los vectores multicopia (plásmidos, cósmidos).

Las principales ventajas de construir una biblioteca metagenómica son: disponer de un reservorio del metagenoma en estudio, la posibilidad de identificar grupos de genes relacionados con la vía metabólica de estudio (por ejemplo operones), y la posibilidad de realizar ensayos funcionales con las enzimas clonadas (Simon and Daniel 2010). Una vez obtenida la biblioteca, la búsqueda de los clones de interés puede realizarse utilizando técnicas moleculares basadas en la similitud a nivel de la secuencia de ADN, como ensayos de hibridación o PCR. Este enfoque se ha utilizado para analizar fragmentos genómicos de microorganismos de un grupo filogenético en particular, a través de la búsqueda del gen ARNr 16S (Quaiser, Ochsenreiter et al. 2003; Woebken, Teeling et al. 2007; Gomez-Pereira, Schuler et al. 2012); y para la búsqueda de nuevas enzimas teniendo como blanco un dominio conservado (Ginolhac, Jarrin et al. 2004; Xu, Xiao et

al. 2008). Si bien existe la posibilidad de recuperar genes parciales, si se identifica el gen completo es posible realizar un subclonado en un vector de expresión adecuado y realizar una caracterización bioquímica de la enzima (Schleper, Swanson et al. 1997; Béjà, Aravind et al. 2000; Xu, Xiao et al. 2008). Otras estrategias de búsqueda están basadas en la expresión del gen de interés, para lo cual se utilizan ensayos que permitan visualizar las actividades enzimáticas correspondientes (Cottrell, Moore et al. 1999; Kim, Kim et al. 2007; Suenaga, Ohnuki et al. 2007; Kim, Lee et al. 2008). Con estas estrategias, al no depender de la similitud entre secuencias, aumenta la probabilidad de recuperar genes novedosos y de longitud completa. Sin embargo tienen la limitación de que no todas las actividades enzimáticas poseen un ensayo de visualización simple de realizar a gran escala, y además puede ocurrir que no haya una correcta expresión de todos los genes en el hospedador, especialmente si los genes del metagenoma no están filogenéticamente relacionados con éste (Daniel 2005).

La construcción de una biblioteca también presenta sus desafíos y limitaciones. La complejidad de ciertas comunidades derivadas de ambientes diversos (como suelos o sedimentos) implica la obtención de un gran número de clones a fin de obtener una cobertura adecuada (Daniel 2004; Riesenfeld, Schloss et al. 2004). El laboratorio deberá estar preparado para la manipulación y almacenamiento de los mismos. Además, el proceso de búsqueda de los clones de interés se vuelve muy laborioso si la proporción de los mismos dentro de la biblioteca es baja. La eficiencia se puede mejorar utilizando técnicas de búsqueda diseñadas para procesar un alto número de clones a la vez (*HTS, High Throughput Screening*) (Robertson and Steer 2004; Park, Jeon et al. ; Uchiyama and Watanabe 2008), y/o realizando un paso de enriquecimiento de la muestra previo a la construcción de la biblioteca (Schloss and Handelsman 2003).

### **2.3.2.2 Secuenciación al azar del metagenoma**

El ADN metagenómico en estudio puede ser secuenciado directamente utilizando las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, obteniéndose un muestreo al azar de la información genética. Esta estrategia se ha utilizado en numerosos estudios ecológicos para obtener una visión global de las comunidades microbianas ambientales, incluyendo la caracterización de las propiedades estructurales (quiénes son sus miembros) y funcionales (cuál es su potencial metabólico) (Venter, Remington et al. 2004). Asimismo, se ha empleado para realizar análisis comparativos entre metagenomas (DeLong, Preston et al. 2006; Eisen 2007). Las secuencias obtenidas (lecturas) pueden tener una longitud aproximada entre 150 y 700 pb,



dependiendo de la plataforma comercial utilizada (Tabla 2.2), por lo que a menudo se suelen combinar las lecturas que se superponen con el objetivo de formar regiones contiguas (*contigs*). Este proceso se denomina ensamblado (*assembly*). Los softwares de ensamblado metagenómico están especialmente diseñados para trabajar con datos que provienen de más de una población, es decir, deben ser capaces de discriminar entre las secuencias de diferentes poblaciones para disminuir la probabilidad de generar *contigs* quiméricos (en teoría formados por fragmentos de distintas especies). La obtención de fragmentos más largos mediante el ensamblado facilita los pasos siguientes del análisis que consisten en la búsqueda de genes y la asignación de las posibles funciones (anotación funcional) (Di Bella, Bao et al. 2013). Otra aplicación del ensamblado es la reconstrucción de genomas completos a partir de las lecturas metagenómicas (Tyson, Chapman et al. 2004; Iverson, Morris et al. 2012; Herlemann, Lundin et al. 2013; McLean, Lombardo et al. 2013), para lo cual generalmente se requerirá de una muestra con baja diversidad y de una alta cobertura de secuenciación (Di Bella, Bao et al. 2013).

## 2.4 OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Desde el año 2004, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro Nacional Patagónico, se ha estudiado la ecología microbiana de la biodegradación de hidrocarburos en ambientes costeros de Patagonia (Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Marcos, Lozada et al. 2009; Dionisi, Lozada et al. 2011; Marcos ; Marcos, Lozada et al. 2012). Con un enfoque ecológico y empleando técnicas independientes del cultivo de microorganismos, se han caracterizado las poblaciones degradadoras de hidrocarburos, especialmente de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), como así también la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos intermareales de Patagonia (Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Marcos, Lozada et al. 2009; Marcos). En particular, en el ambiente subantártico crónicamente contaminado de Bahía Ushuaia se ha encontrado gran diversidad de genes novedosos para la biodegradación de HAPs (Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Marcos, Lozada et al. 2009). Con respecto a la biodegradación de hidrocarburos alifáticos, no existen estudios moleculares realizados en este sitio, y es poca la información disponible sobre otros ambientes costeros de zonas frías (Sotsky, Greer et al. 1994; Kuhn, Bellicanta et al. 2009).

El objetivo general de esta Tesis es incrementar nuestro conocimiento sobre las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos alifáticos que habitan ecosistemas marinos crónicamente contaminados de ambientes subantárticos. Para el desarrollo de esta Tesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la diversidad de poblaciones bacterianas con el potencial de degradar hidrocarburos alifáticos presentes en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia, mediante la construcción de bibliotecas de productos de amplificación de fragmentos del gen *alkB*, que codifica para la enzima Alcano monooxigenasa.
2. Evaluar la respuesta de estas poblaciones autóctonas y de la comunidad en general frente a una exposición a petróleo crudo, en condiciones controladas de laboratorio, mediante estrategias basadas en genes biomarcadores tanto filogenéticos (ARNr 16S) como funcionales (*alkB*).
3. Conocer aspectos de diversidad y organización génica de los genes *alkB* característicos de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia, mediante la búsqueda de fragmentos genómicos conteniendo genes *alkB* en el metagenoma clonado (biblioteca metagenómica) y en el metagenoma secuenciado (secuenciación al azar).

---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 SOLUCIONES

**Solución amortiguadora de extracción** (Zhou, Bruns et al. 1996)

Tris-HCl pH 8 100 mM, EDTA 100 mM, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaCl 1,5 M, CTAB 1%

**Solución de transformación Inoue**

Pipes 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM, MnCl<sub>2</sub> 55 mM

**Solución A (cuantificación de ADN)**

TNE filtrado (0,45 µm): NaCl 0,2 M; Tris-Cl 10 mM; EDTA 1mM

Hoechst 0,1 µg/ml

Llevar al volumen final con agua destilada filtrada (0,45 µm).

**TBE**

Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM

#### 3.2 CEPAS BACTERIANAS, VECTORES DE CLONADO Y OLIGONUCLEÓTIDOS

En las siguientes tablas se detallan las cepas bacterianas (Tabla 3.1), vectores de clonado (Tabla 3.2) y cebadores (Tabla 3.3) empleados durante el desarrollo de esta Tesis.

**Tabla 3.1. Cepas bacterianas**

| Cepa                                   | Utilización                               | Descripción   | Referencia     |
|--|---|---|----------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH5α           | Bibliotecas de productos de amplificación | F <sup>-</sup> φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1  | (Hanahan 1983) |
| <i>E. coli</i> EPI300™-T1 <sup>R</sup> | Clonado en fósmidos                       | F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (Str <sup>R</sup> ) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG trfA tonA dhfr | (Epicentre)    |

Tabla 3.2. Vectores de clonado

| Vector                | Utilización  | Referencia                               |
|-----------------------|--|--|
| pCR™ 4-TOPO®          | Plásmido para clonado de productos de PCR              | (Invitrogen)                             |
| CopyControl™ pCC2FOS™ | Fósmido para clonado de fragmentos de ADN de ~30-40 kb | (Epicentre ; Wild, Hradecna et al. 2002) |

Tabla 3.3. Cebadores

| Oligonucleótido | Utilización   | Secuencia (5'-3')  | Referencia  |
|-----------------|---|--|---|
| AlkB484F        | Amplificación de genes <i>alkB</i>                                    | GGKCA YTTCTWCRTYGARCA  | (Olivera, Nieves et al. 2009)                                 |
| AlkB824R        |   | CCGTAGTGYTCRABRTARTT   |   |
| 16S rDNA-27F    | Controlar que las preparaciones de ADN metagenómico son amplificables | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG   | (Weisburg, Barns et al. 1991)                                 |
| 16S rDNA-1492R  |   | TACCTTGTTACGACTT   |   |
| 16S-1055F       | qPCR  | ATGGCTGTCGTCAGCT   | (Lane 1991; Ferris, Muyzer et al. 1996)                       |
| 16S-1392R       |   | ACGGGCGGTGTGTAC  |   |
| 520F            | Obtención de amplicones del gen ARNr 16S                              | AYTGGGYDTAAAGNG  | <a href="http://pyro.cme.msu.edu">http://pyro.cme.msu.edu</a> |
| 802R            |   | TACCRGGGTHCTAATCC,<br>TACCAGAGTATCTAATTC,<br>CTACDSRGGTMTCTAATC,<br>TACNVGGGTATCTAATCC |   |

K = G + T, Y = C + T, W = A + T, R = A + G, B = G + T + C, M = A + C, H = A + T + C, D = G + A + T, S = G + C, N = A + C + G + T, V = G + A + C

### 3.3 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios fueron preparados en agua destilada y ajustados al pH correspondiente con HCl en los casos necesarios. Los medios sólidos fueron preparados por agregado de 1,5% p/v de agar al medio líquido correspondiente.

#### Lysogeny broth (Luria-Bertani, LB) (Sambrook and Russell 2001)

Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l

**SOB**

Tryptona 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM

**3.4 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

Se siguió el método descrito por Inoue y colaboradores (Inoue, Nojima et al. 1990; Sambrook and Russell 2001). Brevemente, se cultivaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  a 18-22°C en medio SOB (0,5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) hasta llegar a una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,40-0,55. Se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en solución de transformación Inoue (10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>) previamente enfriada en hielo. Luego, las células se incubaron durante 10 min en hielo, se centrifugaron y se resuspendieron en solución de transformación Inoue suplementada con DMSO, para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso.

**3.5 MUESTREO DE SEDIMENTOS MARINOS**

Se utilizaron muestras de sedimentos marinos obtenidas en abril del 2006, junio del 2007 y diciembre de 2008 en las costas de la ciudad de Ushuaia (Tierra del Fuego). El muestreo de sedimentos intermareales fue llevado a cabo manualmente durante la marea baja a lo largo de la línea de marea, utilizando tubos de acrílico de 4,4 cm de diámetro interno, del cual sólo se conservó la fracción superior del sedimento (0-3 cm de profundidad). Con el fin de obtener una muestra más representativa del ambiente a estudiar, en cada sitio de muestreo se obtuvieron sedimentos de 7 a 10 puntos al azar, los cuales fueron mezclados antes de ser analizados (muestra compuesta). Las muestras submareales fueron tomadas a 11-12 m de profundidad por medio de buceo utilizando la misma metodología; en este caso se utilizó la fracción 0-5 cm superior del sedimento y las muestras fueron procesadas individualmente. Todas las muestras fueron conservadas a 4 °C durante su transporte al laboratorio. Para el armado de los sistemas experimentales se utilizaron las muestras inmediatamente (sin dejar pasar más de 48 hs desde la llegada al laboratorio, período durante el cual se mantuvieron a 4 °C). Las muestras fueron conservadas a -80 °C para realizar la extracción de ADN metagenómico, o a -20 °C para realizar los estudios fisicoquímicos y los análisis de hidrocarburos.

### 3.6 CONSTRUCCIÓN DE SISTEMAS EXPERIMENTALES DE SEDIMENTO Y AGUA DE MAR

La muestra utilizada para la construcción de los experimentos (OR08) se tomó el 18 de diciembre de 2008. La temperatura del sedimento en el momento que se realizó el muestreo fue de 8,2°C. Se construyeron sistemas experimentales combinando una parte de sedimento fresco con dos partes de agua de mar proveniente de un sitio no contaminado, y filtrada (0,45 µm). La mezcla de agua y sedimento se mezcló vigorosamente, se dejó decantar, y luego se dividió en 3 recipientes de 500 ml, cada uno conteniendo 40 g de sedimento y 80 ml de agua de mar. Cada uno de los recipientes correspondía a una condición experimental: (1) un sistema experimental sin agregado de ninguna sustancia externa (expOR08); (2) un sistema experimental con agregado de 0,46 ml de petróleo crudo liviano (Comodoro Rivadavia, donado gentilmente por la Dra. Marina Nievas, Laboratorio de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas, CENPAT-CONICET) en 115 ml de mezcla de sedimento y agua de mar (0,4 % v/v, expOR08-O); y (3) un sistema experimental 0,4 % (v/v) petróleo crudo liviano con la adición de cloruro de amonio 5 mM y fosfato de sodio 0,25 mM (expOR08-ON). Los tres sistemas se mantuvieron a 15 °C con agitación constante (150 rpm) por 20 días en la oscuridad, luego de los cuales se tomaron muestras para realizar análisis moleculares y de contenido de hidrocarburos.

### 3.7 ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS Y AMBIENTALES

Para todas las muestras se determinó la temperatura y el pH in situ durante el muestreo, utilizando un equipo portátil SG8 SevenGo pro™ (Mettler-Toledo, Columbus, OH). En los casos en que se midió la salinidad, el oxígeno disuelto y la turbidez de la interfase entre el agua y el sedimento, se utilizó un equipo portátil de medición de calidad de agua DKK- WQC-24 (DKK-TOA Corporation, Tokio).

#### 3.7.1 DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

La determinación de los hidrocarburos alifáticos en sedimentos y sistemas experimentales fue realizada en colaboración con la Lic. Marta Commendatore, en el Laboratorio de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas, CENPAT-CONICET. El procesamiento de las muestras y los análisis de hidrocarburos se realizaron siguiendo los procedimientos descriptos por Commendatore y colaboradores (Commendatore, Esteves et al. 2000) y Esteves y colaboradores (Esteves, Commendatore et al. 2006). La medición de los hidrocarburos alifáticos se efectuó por cromatografía de gases de alta resolución con las siguientes características:

cromatógrafo Thermo Trace con autoanalizador TriPlus (Thermo Electron Corporation), columna de silica J & W DB5 (30 x 0,25 x 25), sistema de inyección capilar split-splitless, y detector de ionización en llama. La identificación de hidrocarburos alifáticos resueltos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los estándares correspondientes, y fueron cuantificados utilizando el factor de respuesta de los *n*-alcanos y el área integrada (Esteves, Amín et al. 2006). Para cada muestra, se calcularon las concentraciones individuales de *n*-alcanos desde *n*-C10 hasta *n*-C35, los niveles de los isoprenoides pristano (Pr) y fitano (Fi), los *n*-alcanos resueltos totales ( $\Sigma nalk$ ), alifáticos resueltos totales (ART), la mezcla compleja no resuelta (MCNR), y los hidrocarburos alifáticos totales ( $AT = ART + MCNR$ ). La MCNR comprende una serie de compuestos como cicloalcanos, alcanos ramificados y otros compuestos no resueltos por la columna capilar y eluyen como una montaña por debajo de los compuestos resueltos. Los valores de concentración de hidrocarburos se expresaron como  $\mu g/g$  peso seco, luego de corregir según el contenido húmedo del sedimento.

Para cada muestra, se calcularon los siguientes índices de evaluación (Commendatore and Esteves 2004):

*n*-C17/Pr y *n*-C18/Fi: indican el grado relativo de biodegradación de *n*-alcanos. Valores bajos de estos índices sugieren la presencia de petróleo degradado, y valores altos sugieren poca degradación. Cuando las concentraciones de hidrocarburos también son altas, altos valores del índice sugieren aportes recientes de hidrocarburos.

ART/MCNR: se utiliza para estimar el grado de degradación relativa de los hidrocarburos. Valores bajos indican la presencia de un proceso de degradación, mientras que valores altos sugieren aportes de petróleo fresco. La presencia de la MCNR usualmente se asocia con hidrocarburos derivados del petróleo.

$\Sigma BPM/\Sigma APM$ : relación entre la suma de los *n*-alcanos  $\leq C20$  (BPM, bajo peso molecular), y la suma de los *n*-alcanos  $\geq C21$  (APM, alto peso molecular). Estimación de la biodegradación relativa de compuestos más livianos durante los experimentos.

## 3.8 MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 3.8.1 CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN se cuantificó mediante el colorante Hoechst 33258 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en un fluorómetro Hoefer DyNA quant 2000 (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA), o en el fluorómetro QuantiFluor™-ST (Promega, Madison, WI), de acuerdo al



protocolo del manual correspondiente a cada equipo. Se utilizó una solución amortiguadora (solución A, sección 3.1) como blanco y medio de dilución del estándar y de las muestras incógnitas en los ensayos. Se utilizó ADN de timo de ternero como estándar (100 µg/ml, Promega, Madison, WI).

### 3.8.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La técnica de separación de fragmentos de ADN por electroforesis se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descriptas por Sambrook et. al (Sambrook and Russell 2001). Brevemente, se emplearon geles horizontales de concentraciones de agarosa variables según el tamaño de las moléculas de ADN que se deseaban separar. Los geles se prepararon en solución amortiguadora TBE (sección 3.1). Las muestras a analizar se mezclaron con la solución de siembra 1X (solución concentrada 6X: 0,25% azul de bromofenol y 40% p/v de sacarosa en agua). Luego de la corrida electroforética, los geles se sumergieron 30 min en bromuro de etidio (0,5 µg/ml), luego se colocaron 20 min en agua destilada, y finalmente se visualizaron empleando un transiluminador de luz UV (Bio-Vision, Francia).

Para aislar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa, se cortó con un bisturí la porción del gel conteniendo la banda de interés y luego se utilizó el kit de purificación comercial Wizard® SV GEL and PCR Clean-Up System (Promega), según las especificaciones del fabricante.

### 3.8.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Cada reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl de mezcla de reacción conteniendo: 50 mM de KCl; 10 mM de solución amortiguadora Tris-HCl pH 9; 0,1% (v/v) del detergente Tritón X-100; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de dNTPs; 0,5 µM de los cebadores correspondientes (Tabla 3.3), 1 U ADN polimerasa Taq (T-Free o T-Plus, Inbio-Highway), y 5 µl de templado a amplificar. Para cada muestra se optimizó la concentración de templado (1-5 ng/reacción). Se utilizó el siguiente programa: 5 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 45 °C (para el par de cebadores AlkB484F-AlkB824R) o a 50 °C (para el par de cebadores 16S rDNA-27F-16S rDNA-1492R) y 30 s a 72 °C; y un paso de elongación final de 15 min a 72 °C.

### 3.9 CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE BIBLIOTECAS DE FRAGMENTOS DE GENES *AlkB*

#### 3.9.1 EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO

Las extracciones se realizaron a partir de 0,5 a 0,8 g de sedimento húmedo, utilizando el FastDNA® SPIN kit for Soil (MP Biochemicals, Solon, OH), siguiendo las instrucciones del fabricante, con las siguientes modificaciones: las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 50 s a aproximadamente 5000 rpm, con intervalos de 1 min (en hielo) utilizando un minibeadbeater Biospec (Bartlesville, OK). El ADN se eluyó en 150 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8, preparado en agua destilada de calidad para biología molecular (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se combinaron dos extracciones de ADN por muestra para su posterior análisis.

#### 3.9.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONADO DE FRAGMENTOS DE GENES *AlkB*

Para cada muestra se realizaron 4 reacciones de PCR por separado, utilizando el par de cebadores AlkB484F-AlkB824R (Tabla 3.3), y los productos de amplificación se combinaron y purificaron a partir de un gel de agarosa 1,5% (p/v). Previo al clonado, se agregó adenina a los extremos de los fragmentos amplificados realizando una incubación de 30 min a 72°C, en presencia de solución amortiguadora de reacción, dATP, MgCl<sub>2</sub>, y ADN polimerasa T-Plus (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), en las mismas concentraciones usadas en las reacciones de amplificación previas. Esto se realizó para permitir la ligación posterior con los extremos conteniendo residuos de timina del plásmido. El clonado se realizó utilizando el TOPO-TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y de (Sambrook and Russell 2001). Brevemente, la mezcla de reacción conteniendo 1 µl del vector, 1 µl de solución de sales y 4 µl de la solución del producto de amplificación, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se tomaron 2 alícuotas de 3 µl para mezclar con 200 µl de células competentes cada una. Se realizó una incubación de 40 min-1 h en hielo. A continuación, las células se colocaron en un baño de agua a 42 °C durante 90 s, y luego se transfirieron nuevamente al hielo por 1-2 min. Finalmente, se les adicionó 800 µl de medio SOC (medio SOB suplementado con glucosa 20 mM) y se las incubó durante 1,5 h a 37 °C con agitación suave (~50 rpm). Para la selección de las células transformantes, se sembraron distintas alícuotas de esta preparación en medio LB sólido suplementado con kanamicina (50 µg/ml). La presencia del inserto en las colonias obtenidas se confirmó mediante reacciones de amplificación a partir de preparaciones de los plásmidos correspondientes (Sambrook and Russell 2001), utilizando el par de cebadores AlkB484F-AlkB824R (Tabla 3.3).

### 3.9.3 SECUENCIACIÓN

Para su secuenciación, los plásmidos fueron purificados utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Se realizó un corte con la enzima de restricción EcoRI a fin de verificar la liberación del inserto correspondiente. Esta reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo 90 mM de Tris-HCl pH 7,5; 50 mM de NaCl; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 µg/ml de BSA; 1 U de enzima, y 1 µg de ADN plasmídico. Las reacciones de corte fueron incubadas a 37 °C durante 4 horas. El resultado del corte se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5 % p/v). La secuenciación fue realizada a través del servicio de secuenciación de MacroGen Korea (Seoul, Corea) o del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, Hurlingham, Buenos Aires).

### 3.9.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE FRAGMENTOS DE GENES *alkB*

Las secuencias obtenidas de fragmentos de genes *alkB* fueron inicialmente visualizadas y editadas (picos dobles o mal asignados) con el programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.). Las secuencias en nucleótidos fueron traducidas a sus correspondientes aminoácidos utilizando el programa BioEdit (Hall 1999). La búsqueda en la base de datos GenBank del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se realizó por medio del algoritmo blastp (Altschul, Gish et al. 1990). El programa mothur v.1.14.0 (Schloss, Westcott et al. 2009) se utilizó para el agrupamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos en Unidades Operacionales Taxonómicas (*Operational Taxonomic Units: OTUs*), y para el cálculo de los siguientes índices:

a) estimadores no paramétricos de la riqueza de especies *Chao1* (Chao 1984), y ACE (Chao, Ma et al. 1993)

$$Chao1 = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

donde  $S_{obs}$  = número de OTUs observados;  $n_1$  = número de OTUs representados por una sola secuencia;  $n_2$  = número de OTUs con sólo dos secuencias

$$ACE = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{F_1}{C_{ACE}} + \gamma_{ACE}^2$$

$$\gamma_{ACE}^2 = \max \left\{ \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} \frac{\sum_{i=1}^{10} i(i-1)F_i}{(N_{rare})(N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right\}$$

donde  $S_{abund}$  = número de OTUs *abundantes*, definidos como aquellos con más de 5 secuencias;  $S_{rare}$  = número de OTUs *raras*, definidos como aquellos con 5 secuencias o menos;  $F_i$  = el

número de OTUs con  $i$  secuencias ( $F_i$  = el número de OTUs con una secuencia);  $C_{ACE} = 1 - F_1/N_{rare}$ ;  $N_{rare}$  = el total de secuencias de todos los OTUs *raros*; y  $\gamma^2_{ACE}$  estima el coeficiente de la variación de los  $F_i$  (Magurran 2004)

b) índice de cobertura de Good (C) (Good 1953)

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

donde  $n_1$  = número de OTUs con una sola secuencia;  $N$  = número total de secuencias muestreadas

Para cada OTU, se seleccionó una secuencia representativa de cada biblioteca para realizar el análisis filogenético. Las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta ClustalX (Thompson, Gibson et al. 1997) dentro del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.0) (Tamura, Peterson et al. 2011). Se obtuvo una matriz de distancias utilizando el modelo de sustitución de Dayhoff, con un tratamiento de supresión de pares de los espacios y datos ausentes (opción “*pairwise deletion of gaps and missing data*”). Esta matriz se utilizó para generar un árbol filogenético con el algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ). Como prueba de confianza de la estructura del árbol se realizaron tests de bootstrap con 1000 repeticiones.

### 3.10 ANÁLISIS BASADOS EN LA SECUENCIACIÓN EN GRAN ESCALA DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S

#### 3.10.1 PIROSECUENCIACIÓN DE AMPLICONES DEL GEN ARNr 16S

La amplificación y pirosecuenciación del fragmento V4 del gen ARNr 16S, a partir del ADN metagenómico correspondiente a las muestras de sedimentos intermareales y sus sistemas experimentales, se realizó a través de la Plataforma de Secuenciación Genómica del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR, Rosario, Santa Fe). Se utilizaron los cebadores bacterianos conservados 520F y 802R, obtenidos del Protocolo de Pirosecuenciación del Proyecto de Base de Datos Ribosomales (Ribosomal Database Project's Pyrosequencing Pipeline, <http://pyro.cme.msu.edu>). Cada cebador contenía los adaptadores de secuenciación Roche 454 A y B, y el cebador 520F también contenía una secuencia de identificación múltiple de 10 nucleótidos (MID, multiple identifier sequence) para diferenciar las muestras. Para cada muestra, se realizaron 4 reacciones de amplificación independientes, en un volumen final de 25  $\mu$ l de mezcla de reacción conteniendo: 2,5  $\mu$ l de FastStart High Fidelity 10X solución amortiguadora (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 20 ng de ADN templado, 0,4

$\mu$ M de cada cebador, 1,25 U FastStart High Fidelity Enzyme Blend (Roche Applied Science) ADN polimerasa, y 0,2 mM de dNTPs. Se utilizó el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 95 °C, 45 s a 57 °C y 60 s a 72 °C, y un paso final de elongación de 4 min a 72 °C. Los productos de PCR purificados se combinaron en cantidades equimolares, fueron inmovilizados en perlas de captura de ADN, amplificados mediante amplificación clonal en emulsión y secuenciados en conjunto en una placa picotituladora en un Secuenciador Genómico FLX (Roche Applied Science) utilizando reactivos químicos Titanium.

La amplificación y secuenciación del fragmento V4 del gen ARNr 16S también se realizó a partir del ADN metagenómico correspondiente a las muestras de sedimentos submareales de Bahía Ushuaia (sitios Orión y Muelle Comercial, Capítulo 3 Resultados y Discusión). Este trabajo se realizó en las instalaciones del DOE Joint Genome Institute (JGI; Walnut Creek, CA).

### 3.10.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS DE LAS SECUENCIAS

#### 3.10.2.1 Tratamiento previo de las secuencias de fragmentos de genes ARNr 16S

Las secuencias obtenidas de fragmentos de genes ARNr 16S fueron analizadas mediante el programa mothur v.1.22.2 (Schloss, Westcott et al. 2009), de acuerdo al procedimiento descrito por Schloss y colaboradores ([http://www.mothur.org/wiki/454\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/454_SOP)) (Schloss and Westcott 2011), con modificaciones menores. En primer lugar, a fin de disminuir el número de secuencias de baja calidad generados durante el proceso de secuenciación, se eliminaron aquellas secuencias que contenían alguna de estas condiciones: al menos un error en el MID, al menos dos errores en los cebadores, al menos una base ambigua (N) en algún sitio de la secuencia, u homopolímeros (bases idénticas consecutivas) de longitud mayor a 6. Asimismo, se recortaron los extremos de las secuencias a partir del sitio en que su valor de calidad promedio (QC) disminuía a menos de 25 (tomando como ventana para el promedio fragmentos de 50 pb). Los fragmentos correspondientes a los cebadores y MID de cada muestra se eliminaron de las secuencias. Las secuencias que pasaron estos filtros fueron alineadas contra el alineamiento de referencia de la base de datos SILVA (<http://arb-silva.de>). Se conservaron aquellas secuencias que se encontraban dentro del mismo espacio en el alineamiento que el 85% del total de secuencias. Como último paso para reducir los errores provenientes de la secuenciación, se utilizó un algoritmo de pre-agrupamiento: las secuencias fueron primero ordenadas de acuerdo a su abundancia, y luego aquellas secuencias raras (menos abundantes) que tuvieran como máximo dos diferencias con alguna secuencia más abundante se agruparon con dicha secuencia

abundante como referencia. Esto se llevó a cabo porque estos errores inflan artificialmente la diversidad de OTUs. Las secuencias muy abundantes generan secuencias poco abundantes que difieren de la secuencia dominante aproximadamente en una base cada 100 bases (Huse, Welch et al. 2010). En el set de datos de este trabajo, cuya longitud promedio se encontraba en 250 nucleótidos, esto corresponde aproximadamente a 2 diferencias. Las quimeras fueron identificadas con la herramienta UCHIME (Edgar, Haas et al. 2011) y eliminadas.

### 3.10.2.2 Análisis basados en OTUs

Se calculó una matriz de distancia genética para agrupar las secuencias en OTUs, en este caso, grupos de secuencias con 97% de identidad (distancia 3%), utilizando el método del “vecino promedio” (*average neighbor*). En este método, para que una secuencia nueva sea agregada a un OTU preexistente, el promedio de las distancias entre la secuencia nueva y las secuencias ya definidas dentro del OTU deberá ser menor al 3%, de lo contrario dicha secuencia iniciará un OTU nuevo (Huse, Welch et al. 2010). A partir de la tabla de OTUs, se calcularon las siguiente métricas de diversidad para las comunidades correspondientes a cada muestra: número de OTUs observados ( $S_{obs}$ ), índice Chao1 (sección 3.9.4), índice de cobertura de Good (sección 3.9.4), y el índice de Simpson (D) (Simpson 1949) según:

$$D = \sum_{i=1}^{S_{obs}} \left[ \frac{n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)} \right]$$

donde  $S_{obs}$  = número de OTUs observados;  $n_i$  = número de individuos en el OTU  $i$ ;  $N$  = número total de individuos en la comunidad

La similitud entre la estructura de las comunidades bacterianas de las diferentes muestras se analizó mediante el índice de Bray-Curtis (Bray and Curtis 1957):

$$Bray - Curtis = 1 - 2 \frac{\sum \min(S_{A,i}, S_{B,i})}{\sum S_{A,i} + S_{B,i}}$$

donde  $S_{A,i}$  = número de secuencias en el OTU  $i$  de la comunidad A;  $S_{B,i}$  = número de secuencias en el OTU  $i$  de la comunidad B ; min se refiere al valor mínimo entre los dos anteriores

### 3.10.2.3 Análisis basados en la asignación taxonómica de las secuencias

Las secuencias fueron clasificadas taxonómicamente con el programa mothur mediante comparación con la Base de Datos SILVA (<http://arb-silva.de>), utilizando el método de Wang et

al. (Wang, Garrity et al. 2007), con 60% de bootstrap como valor de confianza. Este valor representa el consenso mínimo necesario para clasificar una secuencia dentro de un nivel taxonómico dado. Cada secuencia fue asignada, de acuerdo a su clasificación, al nivel taxonómico más bajo posible (que cumpliera con el valor de confianza mínimo). De esta manera, algunas secuencias pudieron ser asignadas a nivel de género, mientras que otras sólo pudieron ser asignadas a nivel de orden ó filo (por ejemplo “Flavobacteriales no clasificadas”; “Proteobacteria no clasificadas”) y otras quedaron completamente sin clasificar (por ejemplo, “Bacteria no clasificadas”). Las secuencias clasificadas como cloroplastos fueron eliminadas.

### 3.11 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA METAGENÓMICA OR07-BM

#### 3.11.1 EXTRACCIÓN DE ADN METAGENÓMICO

Se realizó una extracción directa del ADN del sedimento a partir del protocolo desarrollado por Zhou et al. (Zhou, Bruns et al. 1996). Para ello, se resuspendieron 5 g de sedimento húmedo en solución amortiguadora de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 M NaCl, 1% CTAB). Se realizó una digestión con proteinasa K a 37 °C, durante 30 min con agitación (225 rpm). A continuación, se realizó una incubación (2 horas, 50 rpm) a 65 °C en presencia de 20% SDS. La preparación se centrifugó a 6000 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante, y a partir del precipitado se realizaron dos extracciones más, incubando nuevamente con SDS a 65 °C (10 min). Los tres sobrenadantes obtenidos se combinaron y se mezclaron por inversión con el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se realizó una centrifugación a 10.000 g durante 5 min, recuperándose el sobrenadante. El ADN se precipitó con 0,6 V de isopropanol (a temperatura ambiente durante toda la noche), se recuperó por centrifugación a 16.000 g durante 20 min, y se lavó con etanol 70 % (centrifugación a 16.000 g, 10 min). El ADN se eluyó en solución amortiguadora Tris-HCl pH 8. El tamaño y calidad del ADN purificado se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa (0,7 % p/v) de 20 cm de largo, siendo las condiciones de corrida: 16 horas a 45 V.

#### 3.11.2 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS CLONES

Se utilizó el CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit (Epicentre), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con modificaciones menores. El protocolo detallado se encuentra en (Loviso 2014). Brevemente, luego de la purificación, cuantificación y verificación de la calidad del ADN metagenómico correspondiente a la muestra de sedimentos OR07, se realizó la

reparación de los extremos del ADN de manera de generar extremos romos 5' fosforilados. A continuación, se realizó una selección por tamaño del ADN. Para ello, la muestra se sembró en un gel de 20 cm de largo preparado con agarosa de baja temperatura (0,85% p/v), y se realizó una electroforesis (16 horas, 45 V). Al finalizar se escindió la banda comprendida entre ~30-40 kb, tomando la precaución de no teñir con bromuro de etidio y exponer a la luz UV esa parte del gel. Para esto en el gel también se sembraron como guías el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Extensión Ladder (Invitrogen) y el Fosmid Control DNA provisto en el CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit, el cual consta de un solo fragmento de 42 Kb. El ADN del tamaño seleccionado fue luego purificado a partir de la banda de agarosa escindida, de acuerdo al protocolo del CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit. Luego se realizó la reacción de ligación del ADN con el vector de clonado CopyControl pCC2FOS. El ADN ligado fue empaquetado utilizando los extractos de empaquetamiento del fago lambda provistos en el kit (*MaxPlax Lambda Packaging Extracts*). Se realizaron diluciones seriadas de la mezcla de empaquetado y se usaron para infectar células de *E. coli* EPI300-T1<sup>R</sup>. Las células infectadas se sembraron en placas de LB suplementadas con cloranfenicol y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) en cada placa a fin de calcular el título de los clones empaquetados (ufc/ml). Esta información se utilizó al momento de infectar y sembrar la totalidad de los clones de la biblioteca, a fin de obtener alrededor de 100 colonias por placa. Cada placa de ~100 colonias fue lavada con 1 ml de LB con 20% glicerol a fin de obtener una suspensión de los clones, la cual fue almacenada a -80°C para su conservación.

### 3.11.3 BÚSQUEDA DE LOS CLONES CONTENIENDO GENES ALKB

La búsqueda de los clones de interés se dividió en tres etapas:

1. *Búsqueda de grupo positivo:* se centrifugaron 50 µl de cada *stock* de células guardado a -80°C. Las células recolectadas se resuspendieron en 25 µl de agua destilada, para luego utilizar 5 µl de esta suspensión como templado en las reacciones de PCR (volumen final 25 µl). Los cebadores utilizados fueron AlkB484F y AlkB824R (Tabla 3.3). Se modificó el primer paso del programa de PCR para incluir un paso más largo de desnaturalización a 95 °C (15 minutos).
2. *Búsqueda de grupo positivo:* una vez identificado un *stock* positivo, se realizaron diluciones seriadas del mismo a fin de sembrar alícuotas de aproximadamente 25-50 colonias por placa. Se obtuvo un duplicado de cada placa y luego la placa original se lavó con 1 ml de solución fisiológica. Se centrifugaron 50 µl de esta suspensión, las células



recolectadas se lavaron con agua destilada y finalmente se resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua destilada. Se utilizaron 5  $\mu$ l de esta suspensión como templado en las reacciones de PCR.

3. *Búsqueda de clon individual positivo:* al encontrar un subgrupo positivo, se prepararon cultivos líquidos (2,5 ml LB con cloranfenicol) de todas las colonias correspondientes a la placa positiva duplicada. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Se recolectaron por centrifugación 50  $\mu$ l de cada cultivo, las células recolectadas se lavaron y resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua destilada, y se usaron 5  $\mu$ l como templado en las reacciones de PCR. Una vez identificado el clon individual que dio origen a la señal positiva, a modo de confirmación se repite la reacción de PCR utilizando como templado una preparación del fósido correspondiente obtenida mediante el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

#### 3.11.4 PREPARACIÓN DE LOS FÓSMIDOS SELECCIONADOS PARA SU SECUENCIACIÓN

Se realizaron extracciones de los fósidos utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), a partir de 10 ml de cultivo en medio LB suplementado con cloranfenicol y solución autoinductora (Epicentre). La solución autoinductora induce a que el fósido pase de estar en una sola copia a ser multicopia, de manera de aumentar el rendimiento al momento de su purificación. Los cultivos se crecieron durante 15 horas a 37 °C con agitación vigorosa. La calidad de las preparaciones se evaluó calculando la relación de absorbancias a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Asimismo, se realizaron dos digestiones enzimáticas, una con NotI y otra con EcoRI, en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo: 0,1  $\mu$ g/ml BSA, 1 U de cada enzima, 1  $\mu$ g de ADN fósido, y la solución amortiguadora de reacción correspondiente. Para la enzima NotI la solución amortiguadora utilizado está formado por: 6 mM Tris-HCl (pH 7,9), 0,15 M NaCl, 6 mM  $MgCl_2$  y 1 mM DTT. Para la enzima EcoRI la solución amortiguadora utilizado está formado por: 90 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl y 10 mM  $MgCl_2$ . Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 4 horas, y los patrones de restricción se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (0,7 % p/v, 44 V, 14 horas). A fin de determinar el grado de contaminación de las preparaciones de fósidos con ADN genómico de la célula huésped *E. coli*, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) con cebadores correspondientes al gen ARNr 16S (16S-1055F y 16S-1392R) (Lane 1991; Ferris, Muyzer et al. 1996). Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Chromo4 (BioRad) en un volumen final de 20  $\mu$ l, conteniendo: 10  $\mu$ l PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (Quanta Biosciences), 500 nM

cebadores (2 µl), y 10 o 25 ng de ADN fósmidico. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C y un paso de detección de la fluorescencia. Como estándar se utilizaron plásmidos linealizados conteniendo el gen ARNr 16S de *E. coli* DH5-α. El número de copias del estándar fue calculado en base a la siguiente fórmula, considerando un peso molecular de 660 Da por cada par de bases:

$$\text{Número de copias } \mu\text{l}^{-1} = \frac{[\text{estándar}] \text{ g } \mu\text{l}^{-1} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{\text{longitud del standard (pb)} \times 660 \text{ Da (g mol}^{-1} \text{ pb}^{-1})}$$

Se preparó una solución *stock* del estándar a una concentración de  $10^9$  copias/µl, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas conteniendo  $10^8$ ,  $10^6$  y  $10^4$  copias por reacción de qPCR. Estas diluciones se utilizaron para construir la curva de calibración del ensayo para obtener el número de copias del gen ARNr 16S de las preparaciones de fósmidos (muestras incógnitas). Asumiendo que toda cuantificación del gen ARNr 16S provenía de la presencia de ADN genómico de *E. coli* y considerando 7 copias del gen por cromosoma y un peso molecular del cromosoma de  $5 \times 10^9$  µg (Blattner, Plunkett et al. 1997), se calculó la masa correspondiente a ADN genómico con la siguiente fórmula:

$$\text{ADN genómico de } E. coli / \text{reacción} = 5 \times 10^9 \times \text{número de copias del gen ARNr 16S} / 7$$

Finalmente, para cada preparación de ADN fósmidico se calculó la relación entre la masa de fósrido y la masa de ADN genómico contaminante con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ADN fósrido}}{\text{ADN } E. coli} = \frac{\text{masa preparación fósridica agregada} - \text{masa ADN } E. coli}{\text{masa ADN } E. coli}$$

### 3.11.5 SECUENCIACIÓN Y ENSAMBLADO

Los fósmidos fueron secuenciados y ensamblados en su totalidad en la Plataforma de Secuenciación Genómica del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR, Rosario, Santa Fe), utilizando la tecnología Roche 454 GS-FLX Titanium, y el programa Newbler 2.6 (Margulies, Egholm et al. 2005).

### 3.11.6 PREDICCIÓN DE GENES Y ANOTACIÓN

En primer lugar, se removió la secuencia correspondiente al vector utilizando el programa Artemis comparison tool (ACT) (Carver, Rutherford et al. 2005). Se utilizaron los servicios de anotación automática para procariotas Integrative Services for Genomic Analysis (ISGA, The Prokaryotic Annotation Pipeline) (Hemmerich, Buechlein et al. 2010), y Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST: <http://rast.nmpdr.org/>) (Aziz, Bartels et al. 2008). Además se utilizó la versión en línea del programa FGENESB (Softberry, <http://linux1.softberry.com/>) (Solovyev V. and Salamov A. 2011) para hacer una predicción básica de operones y localización de genes. La anotación final se realizó manualmente combinando los resultados de los tres métodos, más los resultados de las búsquedas en la base de datos de proteínas del NCBI mediante el algoritmo blastp (Altschul, Madden et al. 1997). También se verificó la ausencia de marcos abiertos de lectura (*Open Reading frames, ORFs*) en las regiones intergénicas mediante la comparación con las bases de datos del NCBI utilizando los algoritmos blastn (Zhang, Schwartz et al. 2000) y blastx (Altschul, Madden et al. 1997). Para la anotación final también se utilizaron bases de datos de familias de proteínas y herramientas en línea como ser Pfam (<http://pfam.janelia.org/>) (Punta, Coggill et al. 2012), KAAS (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>) (Moriya, Itoh et al. 2007) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Quevillon, Silventoinen et al. 2005). El programa PolyPhobius (<http://phobius.sbc.su.se/poly.html>) se utilizó para la predicción de segmentos transmembrana.

### 3.11.7 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

Se realizó combinando los resultados de los siguientes métodos: clasificación de los ORFs individuales con el software MEGAN4 (Huson, Mitra et al. 2011); y realizando una búsqueda contra la base de datos de genomas del NCBI con el algoritmo blastn y la secuencia completa de los insertos como entrada (*query*) (Zhang, Schwartz et al. 2000). Los parámetros utilizados en el MEGAN4 fueron: *min support* 1; *min complexity* 0; *min score* 100; *top-percent filter* 20%; *win score* 0. Los resultados obtenidos con el MEGAN4 fueron reportados al nivel de filo.

Además, se realizaron análisis filogenéticos de un fragmento del gen ARNr 23S (976 pb) relacionado con Planctomycetes, que fue encontrado en uno de los fósidos. Para ello, se obtuvieron secuencias relacionadas correspondientes a la subunidad mayor del ARNr de la base de datos SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) (Quast, Pruesse et al. 2013). Para las secuencias del filo Planctomycetes, se conservaron aquellas secuencias con longitud mayor a 2000 pb. Como grupo externo se utilizaron secuencias representativas de los filos Verrucomicrobia (números de

acceso de Genbank: CP001032, CP001998, CP001071, AM905425, ABIZ01000001, AF245378), *Chlamydia* (números de acceso de Genbank: CP001928, FR872580, ACTJ01000001, ABYD01000001, AE001363, AE015925, AEZD01000003) y *Lentisphaera* (número de acceso de Genbank: ABCK01000018). En los análisis también se incluyeron secuencias representativas del filo *Bacteroidetes* (números de acceso de Genbank: AHHE02000109, ABIB01000002, AAMZ01000003, AANA01000001, CP003156, CP002691, CP002542, ALWO01000053, AMZY01000031, CP003191) con fines comparativos. Todas las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalX 2.1 (Larkin, Blackshields et al. 2007), y este alineamiento fue recortado para conservar la región correspondiente a la secuencia del fragmento del ARNr 23 del fósido. Los análisis filogenéticos se realizaron con el software MEGA 5 (Tamura, Peterson et al. 2011), utilizando el algoritmo Neighbor Joining (modelo de dos parámetros de Kimura, tasa de variación uniforme entre sitios), el algoritmo Máxima Parsimonia (método Subtree-Pruning-Regrafting), y el algoritmo Máxima Verosimilitud (modelo de dos parámetros de Kimura, método Subtree-Pruning-Regrafting). En los tres métodos, se realizó una supresión parcial de los sitios con espacios (gaps) y datos ausentes, eliminando aquellos sitios con posiciones ambiguas en más del 95% de las secuencias totales. Como prueba de confianza, se realizó la prueba de bootstrap con 1000 replicaciones.

### 3.11.8 COMPARACIÓN CON OTROS GENOMAS

Se utilizó el programa Artemis (Rutherford, Parkhill et al. 2000) para la visualización de la organización génica de los fósidos. Los análisis comparativos con otros genomas se realizaron mediante las herramientas en línea de la base de datos SEED (<http://rast.nmpdr.org/>) (Aziz, Bartels et al. 2008).

## 3.12 ANÁLISIS DE SECUENCIAS ALKB DEL SET DE DATOS DE SECUENCIACIÓN AL AZAR DEL METAGENOMA DE SEDIMENTOS DE BAHÍA USHUAIA

En el marco de un proyecto de colaboración internacional con iniciativa del Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENPAT-CONICET, se realizó la secuenciación en gran escala del metagenoma de sedimentos submareales provenientes de dos sitios de Bahía Ushuaia: la Planta Orión (OR, analizado en otros puntos de este trabajo) y el Muelle Comercial (MC, a 500 m de OR). Se secuenciaron 3 muestras por sitio (separadas entre sí por 3-5 m), dando un total de 6 muestras. La secuenciación fue realizada en un secuenciador Illumina HiSeq™ 1000,

utilizando una calle por muestra, en las facilidades del Instituto DOE Joint Genome Institute (Walnut Creek, CA).

### 3.12.1 BÚSQUEDA IN SILICO DE SECUENCIAS ALKB

El set de datos resultante, formado por un total de 3.65E+08 secuencias, provenientes de datos ensamblados y no ensamblados, se encuentra disponible en el sitio *Integrated Microbial Genomes with Microbiome Samples* (IMG/M, <http://img.jgi.doe.gov/>) con los siguientes números de identificación (*IMG genome IDs*): 3300000122 (OR), 3300000242 (OR), 3300000118 (OR), 3300000121 (MC), 3300000131 (MC), 3300000125 (MC). Mediante el sistema IMG (Markowitz, Chen et al. 2013), se realizó una búsqueda de secuencias AlkB, utilizando como filtro de búsqueda el número de EC correspondiente a esta enzima (1.14.15.3). Se conservaron sólo aquellas secuencias de longitud mayor a 80 aminoácidos y que contuvieran al menos uno de los motivos conservados de histidina de la familia AlkB (*Histidine box 1*, *Histidine box 2*, *Histidine box 3*, y *HYG*) (Smits, Röthlisberger et al. 1999).

### 3.12.2 CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS ALKB

La clasificación de las secuencias se realizó utilizando dos métodos. Por un lado, se utilizó el software MEGAN4 (Huson, Mitra et al. 2011). Por otro lado, se construyeron árboles filogenéticos y las secuencias metagenómicas se clasificaron en grupos previamente definidos, de acuerdo a los valores de bootstrap observados.

### 3.12.3 CLASIFICACIÓN CON MEGAN4

Las secuencias AlkB se enfrentaron con la base de datos no redundante de secuencias de proteínas (NCBI) mediante el algoritmo standalone blastp (Tao T. 2010), y los resultados fueron procesados con el software MEGAN4 (Huson, Mitra et al. 2011). Los parámetros utilizados fueron: *min support* 1; *min complexity* 0; *min score* 100; *top-percent filter* 20%; *win score* 0. Los resultados obtenidos fueron reportados al nivel de filo.

#### 3.12.3.1 Construcción de árboles filogenéticos

En todos los casos, se utilizó el software ClustalX 2.1 para construir los alineamientos. Se obtuvo una matriz de distancias utilizando el modelo de sustitución de Dayhoff, con un

tratamiento de supresión de a pares de los espacios y datos ausentes. Esta matriz se utilizó para generar un árbol filogenético con el algoritmo NJ, utilizando el software MEGA 5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Como prueba de confianza se realizó el test de bootstrap con 1000 replicaciones.

En primer lugar, se llevó a cabo un alineamiento de referencia a partir de secuencias AlkB completas obtenidas de la base de datos del NCBI, y se definieron los grupos para la clasificación de las secuencias AlkB, de acuerdo a los valores de bootstrap observados. Luego, las secuencias obtenidas del metagenoma (sección 3.12.1) se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a la presencia de cada uno de los cuatro motivos de histidina conservados para esta familia de enzimas (Smits, Röthlisberger et al. 1999). Además, se estableció un quinto grupo conteniendo las secuencias AlkB de longitud completa. Las secuencias de estos grupos se alinearon por separado, y luego cada sub-alineamiento fue alineado al alineamiento de referencia utilizando el modo “alineamiento de perfiles” (*profile alignment mode*) del software ClustalX 2.1. Los cinco alineamientos resultantes se utilizaron para construir árboles filogenéticos tal como se describió anteriormente.

#### 3.12.4 ANÁLISIS DE LOS SEGMENTOS CONTIGUOS (CONTIGS)

Se analizó el contexto genómico de las secuencias AlkB de longitud completa. Los fragmentos genómicos correspondientes (*contigs*) se compararon contra la base de datos de genomas del NCBI utilizando el algoritmo blastn. Asimismo, la visualización de la organización génica y la comparación con otros genomas se realizaron a través del sistema IMG (Markowitz, Chen et al. 2013).

### 3.13 NÚMEROS DE ACCESO

Las secuencias de fragmentos de genes *alkB* obtenidas en este trabajo (sección 3.9) fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso: JQ437615–JQ437743. Las secuencias de fragmentos de genes ARNr 16S obtenidas en este trabajo (sección 3.10) fueron depositadas en la base de datos SRA del NCBI con el número de acceso SRA049611. Las secuencias completas de los fósidos obtenidas en este trabajo (sección 3.11) fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso KP216408 (fósido #401), y KP216409 (fósido #964). Las secuencias de fragmentos de genes *alkB* obtenidas del set de datos de secuenciación al azar del metagenoma se encuentran en el Apéndice como Figura A1.

Los cuatro *contigs* utilizados en este trabajo también se encuentran disponibles en el sitio IMG/M con las identificaciones (*IDs/names*) TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1004147, TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1000452, TDF\_OR\_ARG03\_113mDRAFT\_c1007828, TDF\_OR\_ARG05\_123mDRAFT\_1008004.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CAPÍTULO 1: DIVERSIDAD DE POBLACIONES BACTERIANAS CON POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE ALCANOS EN SEDIMENTOS COSTEROS DE BAHÍA USHUAIA

#### 4.1.1 INTRODUCCIÓN

Los alcanos ingresan en los ambientes marinos como resultado de actividades humanas relacionadas con la utilización del petróleo y gas natural, como así también mediante filtraciones naturales, o biosíntesis mediada por diferentes organismos (Kvenvolden and Cooper 2003; NRC National Research Council 2003; Formolo 2010; Wackett 2010). Los sedimentos marinos constituyen los repositorios principales de estos compuestos, desde donde pueden acceder los organismos que forman las redes tróficas adyacentes (Harris, Yunker et al. 2011; Sammarco, Kolian et al.). Las bacterias comprenden la mayor parte de la biomasa de los sedimentos, cumpliendo importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, y metales diversos, como así también en la degradación de contaminantes (Nealson 1997; Wu, Kellogg et al. 2008; Cravo-Laureau and Duran). Una gran variedad de bacterias presentan la capacidad de utilizar los alcanos como fuente de carbono y energía. En el ambiente marino, bacterias de los géneros *Alcanivorax* (Yakimov, Golyshin et al. 1998), *Thalassolituus* (Yakimov, Giuliano et al. 2004), *Oleiphilus* (Golyshin, Chernikova et al. 2002), y *Oleispira* (Yakimov, Giuliano et al. 2003), denominadas hidrocarbonclásticas, se han propuesto como ecológicamente relevantes para la remoción aeróbica de alcanos (Head, Jones et al. 2006; Yakimov, Timmis et al. 2007). Las bacterias hidrocarbonclásticas se encuentran altamente especializadas en la utilización de hidrocarburos (aromáticos y alifáticos) como única fuente de carbono y energía, mientras que son incapaces de utilizar otras fuentes de carbono “tradicionales” como azúcares o aminoácidos (Gauthier, Lafay et al. 1992; Yakimov, Golyshin et al. 1998; Huu, Denner et al. 1999; Yakimov, Giuliano et al.). Por otro lado, el clado *Roseobacter* (familia *Rhodobacteraceae*, clase *Alphaproteobacteria*) constituye uno de los linajes más representados en diversos ambientes marinos, donde llevan a cabo importantes procesos biogeoquímicos (Buchan, Gonzalez et al. 2005; Wagner-Dobler and Biebl 2006). Recientemente, varios estudios han relacionado a los miembros de este clado con la biodegradación de hidrocarburos. Se observó que son uno de los grupos que proliferan en experimentos controlados de exposición a hidrocarburos (Brakstad and Lodeng 2005; Coulon, McKew et al. 2007; McKew, Coulon et al. 2007; Lanfranconi, Bosch et al. 2010). Asimismo, en los genomas secuenciados de miembros de este grupo se identificaron genes codificantes para enzimas involucradas en la degradación de

alcanos, así como también vías para la degradación aeróbica de compuestos aromáticos (Buchan and González 2010).

El primer paso en el metabolismo aeróbico de alcanos requiere de una alta energía de activación, y para ello existen diferentes sistemas enzimáticos de acuerdo a la longitud de la cadena carbonada del sustrato (van Beilen and Funhoff 2007). El sistema alcano hidroxilasa AlkB, el cual oxida alcanos de longitud  $C_5$ - $C_{16}$ , se encuentra ampliamente distribuido en bacterias degradadoras aeróbicas. Está formado por una monooxigenasa integral de membrana (alcano monooxigenasa, AlkB), y dos proteínas solubles encargadas del transporte de electrones rubredoxina (AlkG) y rubredoxina reductasa (AlkT) (Rojo). Los sistemas AlkB también tienen propiedades interesantes para su uso en la producción de compuestos de relevancia industrial (Schrewe, Magnusson et al. 2011; Julsing, Schrewe et al. 2012). Los genes *alkB* han sido ampliamente utilizados como biomarcadores funcionales para la caracterización de poblaciones bacterianas degradadoras de alcanos en diferentes ambientes, incluyendo suelos (Pérez-de-Mora, Engel et al. 2010; Jurelevicius, Alvarez et al. 2013), sedimentos marinos costeros y profundos (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009), y agua de mar (Wang, Wang et al. 2010). Recientemente también se han utilizado como indicadores en la prospección microbiana de petróleo y gas (Xu, Tang et al. 2013).

El sitio de estudio correspondiente a esta Tesis se encuentra en las costas de la ciudad de Ushuaia. La ciudad de Ushuaia está ubicada a orillas del Canal de Beagle, en el extremo sur de la Isla Grande de Tierra del Fuego, rodeada por los Montes Martial (Figura 4.1.1). El clima es húmedo y templado-frío, con una temperatura promedio de 2,4 °C entre junio y agosto, y de 9,6 °C entre diciembre y febrero (Dionisi, Lozada et al. 2011). Las precipitaciones, 600 mm/año, se distribuyen a lo largo de todo el año, y las nevadas son frecuentes entre mayo y agosto (23 mm/mes) (Gil, Torres et al. 2011). Este ambiente costero está definido desde un punto de vista biogeográfico como región Andina, subregión Subantártica (Morrone 2000). El mismo no sólo está expuesto a bajas temperaturas durante todo el año, sino que en primavera registra altos niveles de radiación UV-B como consecuencia de la disminución de la capa de ozono que ocurre sobre la Antártida (Diaz, Camilion et al. 2006). Bahía Ushuaia es la más grande de las tres bahías sobre las cuales tiene influencia la ciudad de Ushuaia, siendo las otras dos Bahía Encerrada y Bahía Golondrina (Dionisi, Lozada et al. 2011). Bahía Ushuaia recibe cantidades significativas de agua dulce desde el continente, que cambian temporalmente sus características físicoquímicas, e influyen en la distribución de nutrientes (Amin, Comoglio et al. 2010). Todas estas características ambientales resultan en una presión de selección particular para las

poblaciones microbianas autóctonas, las cuales deben adaptarse a fluctuaciones importantes en su ambiente.

El puerto de Ushuaia es un puerto de uso público con destino comercial cuyas principales actividades son la pesca, el turismo y el manejo de cargas generales en bultos y contenedores. Consta de dos muelles, ambos ubicados sobre Bahía Ushuaia: el Muelle Comercial (dependiente de la Dirección Provincial de Puertos) y el Muelle Combustible-Planta Orión. En el Muelle Comercial operan buques de diferentes características, como ser buques de pasajeros y científicos de diferentes banderas, los que efectúan la travesía Antártida y Canales Fueguinos, buques dedicados a la actividad pesquera, y los de transporte de carga general. Por otro lado, la operatoria del Muelle Combustible-Planta Orión consiste en cargas y descargas de buques tanques, embarcaciones medianas (pesqueros, catamaranes, etc.), y embarcaciones menores (veleros y lanchas). Esta terminal opera con derivados pesados del petróleo, gas oil, fuel oil, y nafta ([http://www.nuestromar.org/servicios/puertos/puertos\\_maritimos/pto\\_ushuaia](http://www.nuestromar.org/servicios/puertos/puertos_maritimos/pto_ushuaia)). Debido a la importancia de la conservación de su calidad ambiental, Bahía Ushuaia constituye una de las Zona de Protección Especial designadas por la Prefectura Naval Argentina (Prefectura Naval Argentina 1998). Sin embargo, se encuentra expuesta al vertido de efluentes cloacales e industriales, a la contaminación con residuos urbanos, y a la contaminación crónica con hidrocarburos de origen antropogénico, debido principalmente a una intensa actividad portuaria (Esteves and Amín 2005; Esteves, Commendatore et al. ; Commendatore and Esteves 2007; Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Commendatore, Nievas et al. 2012; Marcos, Lozada et al. 2012).

Previamente a la realización de esta Tesis, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA) del CENPAT se estudiaron aspectos ecológicos y moleculares de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimentos costeros de Patagonia, y en particular de Bahía Ushuaia. Mediante estudios independientes del cultivo, se identificaron en muestras de sedimentos en las cercanías de Planta Orión un total de 22 variantes de genes codificantes para dioxigenasas de HAPs, la gran mayoría de ellas novedosas con respecto a las secuencias disponibles en las bases de datos (Lozada, Riva Mercadal et al. 2008; Marcos, Lozada et al. 2009). Tres de estas variantes novedosas demostraron ser abundantes y estables en el tiempo en un lapso de 6 años, lo cual sugiere que las poblaciones bacterianas portadoras podrían ser miembros ecológicamente relevantes de esta comunidad microbiana (Marcos, Lozada et al. 2012). Asimismo, mediante cromatografía gaseosa de alta resolución, se detectó la presencia de HAPs en el rango de 151-4.127 µg/kg sedimento seco, en las muestras de Planta Orión obtenidas durante el período 2004-2010 (Marcos 2012). La mayoría de los diferentes HAPs (~74%) se

observaron en niveles por encima de los límites establecidos para la calidad ambiental de los sedimentos, y algunos de ellos (~17%) presentaron concentraciones por encima de los valores donde es frecuente que ocurran efectos biológicos adversos (Marcos 2012). Más aún, los sedimentos de este sitio presentaron un incremento en los niveles de hidrocarburos alifáticos totales en el período 2001-2006 (Commendatore M, Esteves JL et al. 2008). En base a estos antecedentes, con este trabajo de Tesis iniciamos los estudios sobre las comunidades microbianas asociadas a la biodegradación de hidrocarburos alifáticos en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia.

En este capítulo, nuestro objetivo fue caracterizar la diversidad de grupos bacterianas con el potencial de degradar alcanos presentes en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia. Para ello, utilizamos dos técnicas independientes del cultivo de microorganismos: el análisis de bibliotecas de fragmentos de genes *alkB* amplificados por PCR (marcador funcional), y el análisis de fragmentos de genes ARNr 16S obtenidos mediante secuenciación en gran escala (marcador filogenético).

#### 4.1.2 RESULTADOS

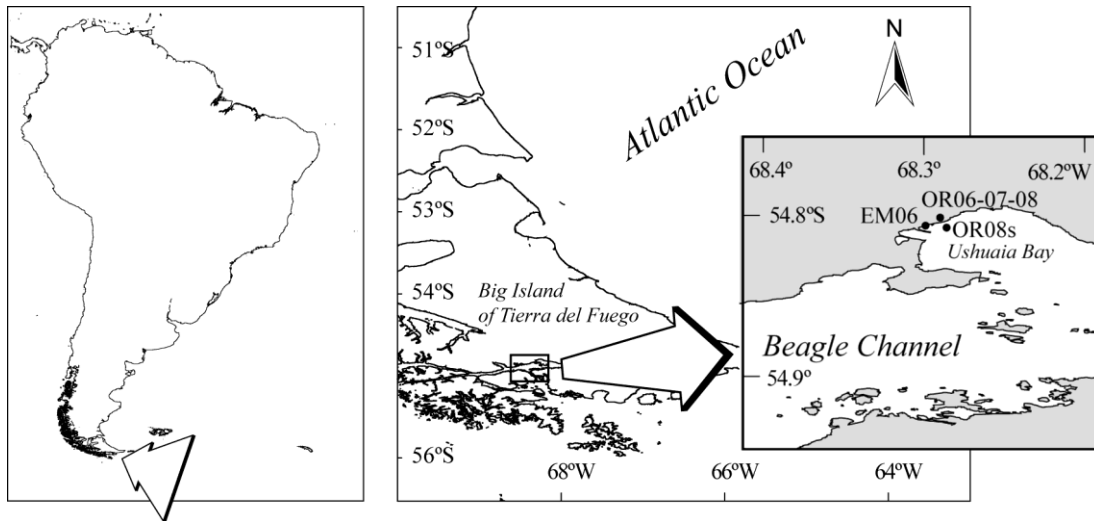
##### 4.1.2.1 Sitio de estudio

Trabajamos con muestras de sedimentos costeros de dos sitios dentro de la Bahía Ushuaia: EM y OR (Figura 4.1.1, Tabla 4.1.1). El sitio OR se encuentra contiguo a la Planta Orión de almacenaje de combustibles; y el sitio EM se encuentra en una zona urbana a 300 m al oeste de la Planta Orión, en un área expuesta a un alto tráfico marítimo al encontrarse entre dos muelles (el Muelle Comercial y el Muelle de la Planta Orión). En un estudio donde se analizaron los niveles de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en sedimentos de diferentes sitios a lo largo de la Bahía Ushuaia, se concluyó que la zona central de la Bahía – que comprende el Muelle Combustible-Planta Orión, el Muelle Comercial, y el Muelle Náutico – constituye una zona de acumulación de hidrocarburos, favorecida por las características de los sedimentos (Commendatore, Nievas et al. 2012).

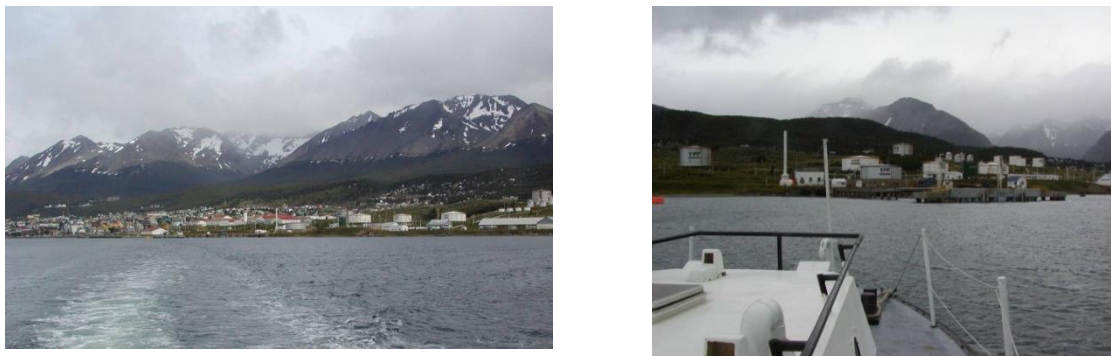
Cuatro de las muestras utilizadas (OR06, OR07, OR08 y EM06) fueron tomadas en la zona intermareal baja. El intermareal es el sector de la costa que queda comprendido entre la bajamar y la pleamar. Esta zona representa un lugar de transición entre los ambientes marinos y terrestres, caracterizado por fluctuaciones periódicas en las condiciones ambientales, como ser cambios en la temperatura y concentración de sales, desecación durante la bajamar, exposición a la radiación

UV, y oleaje (Decho 2000). La quinta muestra utilizada (OR08s) corresponde a un sedimento submareal y fue tomada a 12,3 m de profundidad (Tabla 4.1.1).

**A.**



**B.**



**Figura 4.1.1. A. Ubicación de los sitios de muestro de sedimentos costeros en Bahía Ushuaia.** Las muestras se nombraron de acuerdo a las iniciales de los sitios (OR, EM), y los últimos dos dígitos del año de muestreo. La muestra submareal se indica con una “s” al final (OR08s). **B. Imágenes de Bahía Ushuaia (izquierda) y la Planta de almacenamiento de combustibles Orión (derecha).**

#### 4.1.2.2 Caracterización de los sedimentos costeros de Bahía Ushuaia

La granulometría observada para las muestras de sedimentos comprende el rango arena-grava. La materia orgánica de los sedimentos deriva de restos de plantas y animales, bacterias o plancton, o de fuentes antropogénicas ([http://www.ozcoasts.gov.au/indicators/sediment\\_org\\_matter.jsp](http://www.ozcoasts.gov.au/indicators/sediment_org_matter.jsp)). Se compone de carbono y nutrientes en forma de hidratos de carbono, proteínas, grasas y ácidos nucleicos. Las bacterias rápidamente consumen las moléculas menos resistentes, tales como los ácidos nucleicos y

muchas de las proteínas. El contenido de materia orgánica observado para las cuatro muestras intermareales fue similar, mientras que la muestra submareal OR08s presentó un valor cinco veces mayor, lo que podría deberse a una menor exposición al oxígeno, entre otros factores (Tabla 4.1.1) (Sobek S., Durisch-Kaiser E. et al. 2009).

**Tabla 4.1.1. Características de las muestras de sedimentos costeros utilizadas en este trabajo.**

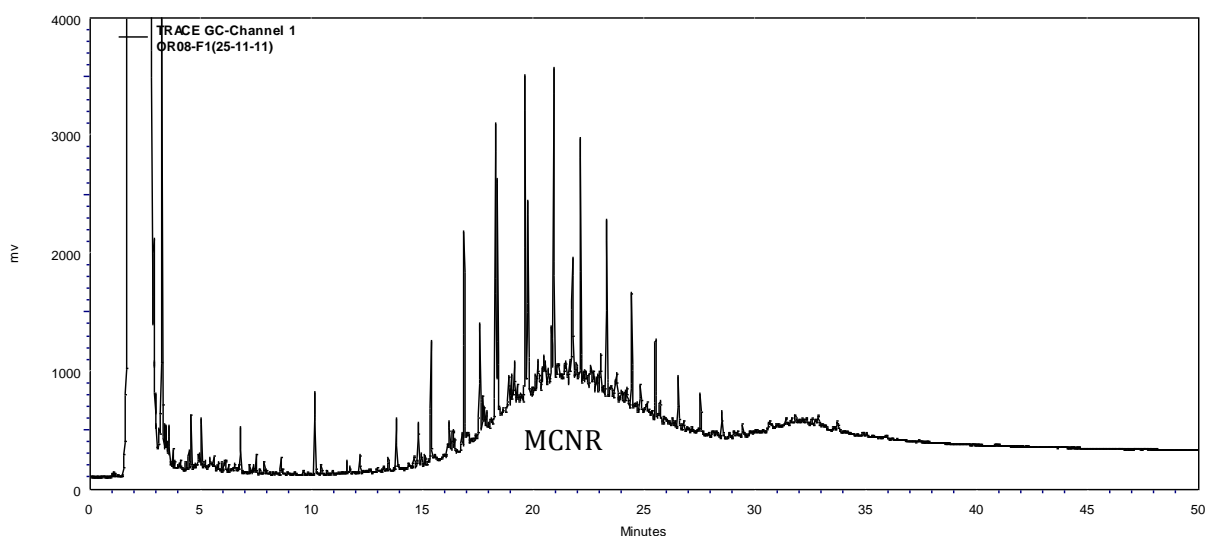
| Muestra | Localización                   | Tipo                  | Fecha de muestreo <sup>(a)</sup> | ph             | Temp. (°C)  | Materia orgánica |
|---------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------|-------------|------------------|
| EM06    | 54° 48' 19" S<br>68° 17' 39" O | intermareal           | 04/06                            | n.d.           | n.d.        | 0,71%            |
| OR06    | 54° 48' 16" S                  | intermareal           | 04/06                            | n.d.           | n.d.        | 0,71%            |
| OR07    | 68° 17' 23" O                  | intermareal           | 06/07                            | n.d.           | n.d.        | 0,84%            |
| OR08    |                                | intermareal           | 12/08                            | 7,36<br>(0,03) | 6,8 (0,04)  | 0,80%            |
| OR08s   |                                | submareal<br>(12,3 m) | 12/08                            | 7,68<br>(0,05) | 8,74 (0,05) | 3,98%            |

<sup>(a)</sup>Se indican los números correspondientes al mes y a los dos últimos dígitos del año (MM/AA). Los valores de desvío estándar se indican entre paréntesis. n.d.: no determinado

#### 4.1.2.2.1 Contenido de hidrocarburos alifáticos

Los sedimentos presentaron valores de hidrocarburos alifáticos totales (AT) en el rango de 19,7 a 347,2 µg/g de sedimento seco. En general, el contenido de hidrocarburos alifáticos de las muestras OR de diferentes años fue bastante estable, mientras que el valor más alto se observó para la muestra EM06 (Tabla 4.1.2). Estos valores se encontraron en el rango considerado por UNEP (*United Nations Environment Programme*) como característico de sedimentos portuarios de áreas urbanas o industriales (United Nations Environment Programme 1992). Según un estudio previo realizado en la costa Patagónica (Commendatore, Nievas et al. 2012), los niveles de AT de las muestras OR corresponden a una contaminación baja, mientras que el valor observado para EM06 corresponde a una contaminación moderada. Todas las muestras presentaron características que indican un origen petrogénico de los hidrocarburos: la serie homóloga de *n*-alcanos, los isoprenoides pristano y fitano, y la mezcla compleja no resuelta (MCNR) (Figura 4.1.2) (United Nations Environment Programme 1992). Los dos picos observados en la distribución de la MCNR en estas muestras sugieren una contribución mixta de petróleo crudo liviano y fracciones más pesadas de hidrocarburos, que podría resultar de la

degradación bacteriana o de otras fuentes de materia orgánica (Voudrias and Smith 1986; Commendatore, Esteves et al. 2000).



**Figura 4.1.2. Perfil obtenido por cromatografía de gases de alta resolución de la fracción de hidrocarburos alifáticos correspondiente a la muestra de sedimento OR08 de Bahía de Ushuaia.** MCNR: mezcla compleja no resuelta. La MCNR comprende una serie de compuestos como cicloalcanos, alcanos ramificados y otros compuestos no resueltos por la columna capilar y eluyen como una montaña por debajo de los compuestos resueltos.

#### 4.1.2.2.2 Índices de diagnóstico

A fin de evaluar si existen procesos de biodegradación en marcha en los sedimentos, se utilizaron diferentes índices de diagnóstico para *n*-alcanos. El efecto temprano de la degradación microbiana se puede monitorear mediante las relaciones entre los compuestos biodegradables y aquellos menos degradables como los índices *n*-C17/Pristano y *n*-C18/Fitano (*n*-C17/Pr y *n*-C18/Fi). Así, valores bajos de estos índices sugieren la presencia de petróleo degradado y valores altos sugieren poca degradación. Los índices *n*-C17/Pr y *n*-C18/Fi estuvieron en el rango 1,13-1,48 (Tabla 4.1.2) lo que sugiere que existen procesos de biodegradación en marcha (Commendatore, Esteves et al. 2000; Wang and Fingas 2003). Otro índice utilizado para estimar la biodegradación relativa es la relación entre el contenido de alifáticos resueltos totales y la mezcla compleja no resuelta (ART/MCNR). Este índice presentó valores bajos (desde 0,12 a 0,21) (Tabla 4.1.2), lo que también sugiere que existen procesos de biodegradación en marcha (Commendatore, Nievas et al. 2012).

**Tabla 4.1.2. Contenido de hidrocarburos alifáticos en las muestras de sedimentos de Bahía Ushuaia, e índices de diagnóstico calculados a partir de los mismos.**

| Muestra | Hidrocarburos alifáticos (µg/g de sedimento seco) |                     |                   | Índices de diagnóstico |                  |          |
|---------|---|---------------------|-------------------|------------------------|------------------|----------|
|         | ART <sup>(a)</sup>                                | MCNR <sup>(b)</sup> | AT <sup>(c)</sup> | <i>n</i> -C17/Pr       | <i>n</i> -C18/Fi | ART/MCNR |
| EM06    | 38,78   | 308,40              | 347,20            | 1,32                   | 1,13             | 0,13     |
| OR06    | 5,09  | 28,03               | 33,12             | 1,27                   | 1,48             | 0,18     |
| OR07    | 8,74  | 68,26               | 77,00             | 1,27                   | 1,34             | 0,13     |
| OR08    | 4,06  | 19,44               | 23,50             | 1,19                   | 1,43             | 0,21     |
| OR08s   | 2,06  | 17,64               | 19,70             | 1,35                   | 1,34             | 0,12     |

<sup>a</sup>Alifáticos resueltos totales. <sup>b</sup>Mezcla compleja no resuelta. <sup>c</sup>Alifáticos totales = ART + MCNR

#### 4.1.2.3 Diversidad de secuencias de genes *alkB*

##### 4.1.2.3.1 Construcción y análisis de bibliotecas de fragmentos de genes *alkB*

Se realizaron extracciones de ADN metagenómico a partir de las muestras de sedimentos utilizando un conjunto de reactivos comerciales específico para suelos y otras muestras ambientales (FastDNA SPINkit for Soil, MP Biomedicals, Estados Unidos). Este es un método de extracción directa con una ruptura mecánica de las células (se utiliza un homogeneizador de alta velocidad y matrices de lisis con esferas de cerámica y sílice), diseñado para una ruptura eficiente de células resistentes, como por ejemplo las bacterias Gram positivas (Maarit Niemi, Heiskanen et al. 2001).

En la figura 4.1.3 A se muestra una corrida electroforética de dos extracciones correspondientes a la muestra de sedimento OR07, una realizada con el kit comercial, y la otra realizada con el método manual desarrollado por Zhou y colaboradores (Zhou, Bruns et al. 1996). Brevemente, el método de Zhou es una técnica clásica utilizada en suelos y consiste en una extracción directa con una ruptura enzimática (proteínasa K) y química (detergente SDS) de las células, y posterior precipitación del ADN con isopropanol (Sección 3.11.1, Materiales y Métodos). El método de kit demostró ser apropiado para esta parte del trabajo ya que es un método rápido de extracción con un rendimiento y tamaño del ADN que si bien son menores a los obtenidos mediante el método manual, son adecuados para las reacciones de PCR (Tabla 4.1.3 y Figura 4.1.3 A). A esto se le suma el alto grado de purificación, el cual es necesario para la remoción de inhibidores de las reacciones de amplificación.

Para la amplificación de los fragmentos de genes *alkB* se utilizaron cebadores con un alto grado de degeneración, y una baja temperatura de hibridación (*annealing*), con el objetivo de

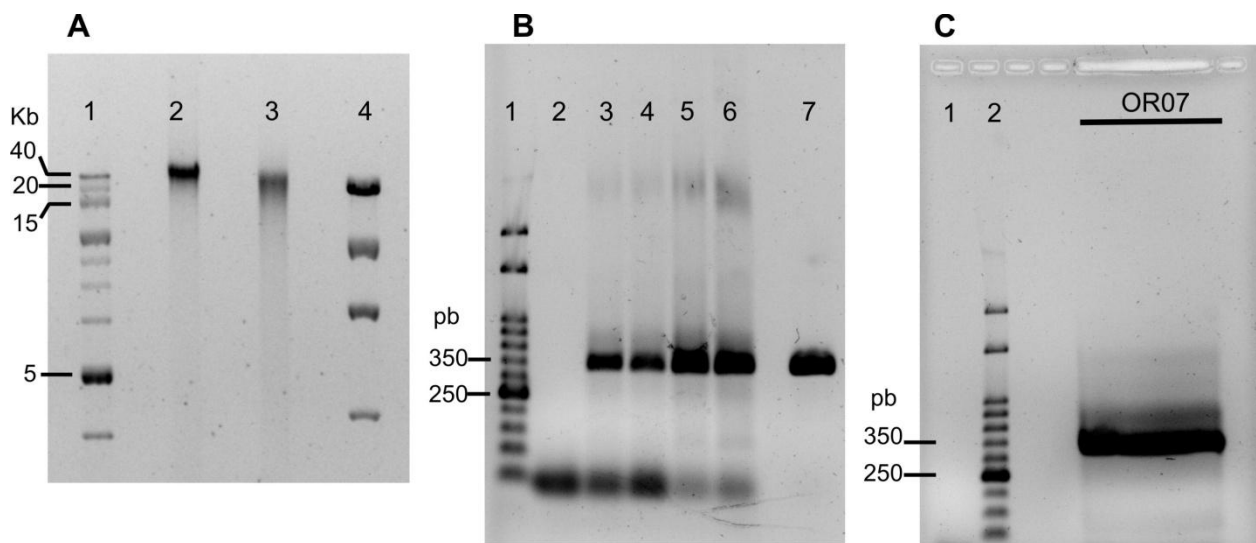


cubrir la mayor cantidad posible de variantes de estos genes en la comunidad de bacterias que habitan los sedimentos. Los cebadores fueron diseñados por nuestro grupo a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos, y fueron utilizados anteriormente para identificar genes *alkB* en microorganismos aislados de consorcios obtenidos a partir de sedimentos marinos de la Patagonia (Olivera, Nievas et al. 2009). Se optimizó la cantidad de ADN templado utilizado para cada muestra (Figura 4.1.3 B), y la concentración de ADN que mostró el producto de amplificación de mayor intensidad y del tamaño adecuado en electroforesis en geles de agarosa se utilizó para la construcción de la biblioteca correspondiente. Como se puede observar en la Figura 4.1.3 B, se logró una buena amplificación del fragmento de interés, si se tiene en cuenta que se trabajó con ADN extraído de una muestra ambiental, donde los genes buscados pueden encontrarse en baja proporción respecto al ADN total y se arrastran contaminantes que pueden inhibir la reacción de PCR a pesar de los métodos de purificación que normalmente se emplean. El ADN purificado a partir de la banda escindida del gel (Figura 4.1.3 C) fue clonado en el plásmido pCR4-TOPO (Invitrogen).

Se secuenciaron un total de 202 insertos. Utilizando el software mothur (Schloss, Westcott et al. 2009) en su versión 1.14.0 que es capaz de analizar secuencias de proteínas, las secuencias fueron agrupadas en Unidades Operacionales Taxonómicas (*Operational Taxonomic Units*, OTUs), definidos a un punto de corte de 80% de identidad al nivel de aminoácidos entre sus integrantes (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009). En general, a partir de las bibliotecas construidas se observaron diferentes variantes de genes degradativos, con buena cobertura (mayor al 85% en todos los casos, Tabla 4.1.4). Las bibliotecas correspondientes a las muestras EM06 y OR07 presentaron la mayor cantidad de OTUs observados ( $S_{obs}$ ), mientras que en la biblioteca correspondiente a la muestra OR06 se observó sólo un OTU (Tabla 4.1.4). Se utilizaron dos estimadores no paramétricos de riqueza, los índices *Chao1* (Chao 1984) y ACE. Ambos estiman el número mínimo de especies presentes en la muestra, estimando el número de especies no observadas a partir de las especies observadas con baja frecuencia (Magurran 2004). De acuerdo a los índices calculados, las muestras con mayor riqueza de secuencias *AlkB* fueron EM06 y OR07 (Tabla 4.1.4).

**Tabla 4.1.3. Concentraciones obtenidas y rendimiento calculado a partir de las extracciones de ADN de las muestras de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia, realizadas con un kit comercial (FastDNA SPINkit for Soil).**

|                                  | OR06 | OR07 | OR08 | OR08s |
|----------------------------------|------|------|------|-------|
| [ADN] (ng/μl)                    | 4,6  | 6,3  | 2,5  | 7,5   |
| Rendimiento (μg ADN/g sedimento) | 0,7  | 0,6  | 0,4  | 1,7   |



**Figura 4.1.3. Geles de agarosa correspondientes a: (A) extracción de ADN de la muestra OR07.** Calles: (1) marcador 1 Kb DNA Extension Ladder (Invitrogen), (2) 150 ng de ADN extraído mediante el método desarrollado por Zhou y colaboradores (Zhou, Bruns et al. 1996), (3) 150 ng ADN extraído mediante el kit comercial FastDNA SPINkit for Soil, (4) marcador  $\lambda$  HindIII (Productos Bio-Lógicos); **(B) puesta a punto de la reacción de amplificación de fragmentos de genes *alkB* a partir del ADN extraído de la muestra OR07.** Calles: (1) marcador Ladder 50 pb (Productos Bio-Lógicos), (2) control negativo, (3) amplificación a partir de 0,6 ng de ADN, (4) amplificación a partir de 1,2 ng de ADN, (5) amplificación a partir de 3 ng de ADN, (6) amplificación a partir de 6 ng de ADN, (7) control positivo. **(C) PCR preparativa para el clonado.** Calles (1) control negativo, (2) marcador Ladder 50 pb, (OR07) corresponde a 4 calles donde se sembraron 3 reacciones de PCR de 25  $\mu$ l cada una. Como templado de cada reacción se utilizaron 3 ng de ADN correspondiente a la muestra OR07. A la izquierda de cada gel se indican los tamaños de algunas bandas de los marcadores de peso molecular utilizados (en kilobases para 1 Kb DNA Extension Ladder y en pares de bases para marcador Ladder 50 pb).

**Tabla 4.1.4. Información de las bibliotecas de productos de amplificación de fragmentos de genes *alkB*.**

| Biblioteca | N <sup>(a)</sup> | S <sub>obs</sub> <sup>(b)</sup> | Cobertura <sup>(c)</sup> | <i>Chao1</i> | ACE        |
|------------|------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------|------------|
| EM06       | 50               | 14                              | 90%                      | 19 (15-46)   | 17 (15-32) |
| OR06       | 30               | 1                               | -                        | -            | -          |
| OR07       | 46               | 12                              | 87%                      | 20 (13-55)   | 39 (20-99) |
| OR08       | 41               | 5                               | 95%                      | 6 (5-13)     | 8 (6-21)   |
| OR08s      | 35               | 8                               | 94%                      | 9 (8-16)     | 9 (8-19)   |

<sup>(a)</sup>número de secuencias analizadas. <sup>(b)</sup>número de OTUs observados con un agrupamiento del 80% de identidad al nivel de la secuencia de aminoácidos. <sup>(c)</sup>Índice de cobertura de Good (Good 1953). Los límites superior e inferior del intervalo de confianza al 95% se indican entre paréntesis.

El análisis conjunto de las secuencias de las cinco bibliotecas permitió identificar un total de 30 OTUs, y estimar una cobertura del 95% para la diversidad general del gen *alkB* en este sitio, limitado sin embargo a lo que se puede amplificar con nuestro par de cebadores (Tabla 4.1.5). La riqueza estimada por los índices Chao1 y ACE – calculados teniendo en cuenta las secuencias de las cinco bibliotecas de productos de amplificación – fue de 48 y 39 OTUs, respectivamente (Tabla 4.1.5). Observamos una variabilidad interna en cada OTU, ya que los mismos contenían secuencias con una distancia promedio hasta 0,14 y el número de OTUs aumentaba al disminuir la distancia de corte: de 48 OTUs cuando éstos eran definidos a una distancia de 0,2 (correspondiente a 80% de identidad a nivel de aminoácidos) a 72 OTUs cuando eran definidos a una distancia de 0,02; Tabla 4.1.5. Por lo tanto, nuestras estimaciones pueden ser consideradas como una medida conservadora de la riqueza *alkB* en este ambiente crónicamente contaminado.

**Tabla 4.1.5. Diversidad de secuencias de genes *alkB* en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia.**

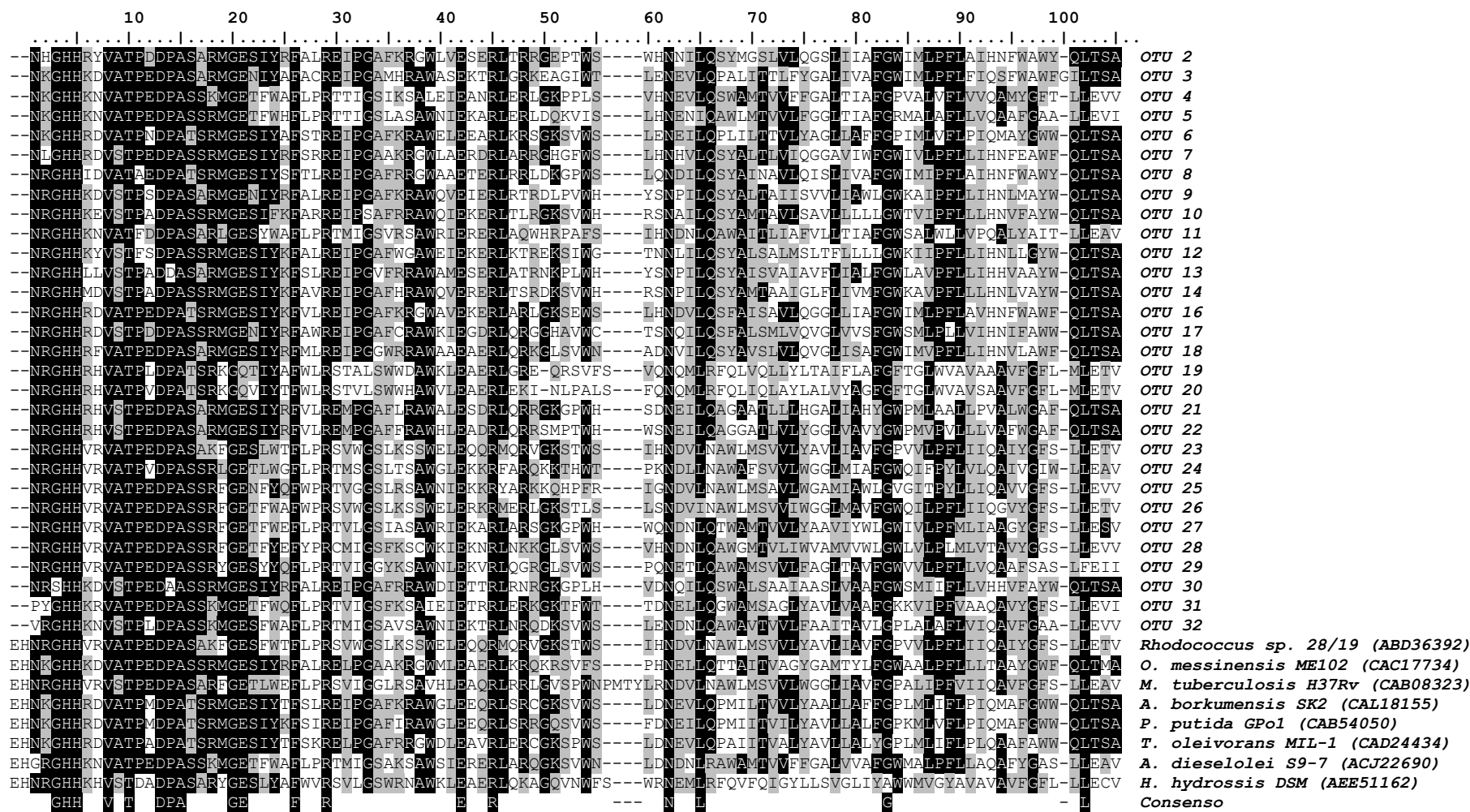
| Número de muestras | N   | Distancia de corte <sup>(a)</sup> | S <sub>obs</sub> | <i>Chao1</i> | ACE         | Cobertura |
|--------------------|-----|-----------------------------------|------------------|--------------|-------------|-----------|
| 5                  | 202 | 0,20                              | 30               | 48 (34–105)  | 39 (32–61)  | 95%       |
|                    |     | 0,02                              | 46               | 72 (55–119)  | 71 (56–109) | 89%       |

Los límites superior e inferior del intervalo de confianza al 95% se indican entre paréntesis.

<sup>a</sup>Distancia genética utilizada para definir los OTUs.

Todas las secuencias proteicas deducidas a partir de las secuencias de fragmentos de genes *alkB* obtenidas en las bibliotecas mostraron relaciones significativas con fragmentos de Alcano monooxigenasas presentes en la base de datos GenBank. En general, los valores de identidad observados estuvieron en el rango entre 50 y 100% (Tabla 4.1.6). Asimismo, a excepción de una secuencia, presentaron las histidinas terminales del motivo II de histidina (EHXXGHH), uno de los cuatro motivos de histidina conservados en esta familia de enzimas, esenciales para la actividad (Figura 4.1.4) (van Beilen, Smits et al. 2005).

Se tomó una secuencia representativa de cada OTU y se realizó un análisis filogenético con secuencias relacionadas de la base de datos Genbank, tanto de microorganismos aislados como de secuencias ambientales de organismos no cultivados. Observamos que las secuencias de genes *alkB* recuperadas presentaron una amplia diversidad filogenética (Figura 4.1.5). La mayoría de las variantes encontradas en las bibliotecas de sedimentos subantárticos estuvieron relacionadas con genes descritos en bacterias del filo Proteobacteria (165 secuencias, 82 %). Un total de 99 de estas secuencias formaron parte de un grupo monofilético amplio y diverso, donde por ejemplo se encuentran Alcano monooxigenasas de diferentes bacterias marinas hidrocarbonoclasticas como ser *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Thalassolituus oleivorans* MIL-1, *Marinobacter* sp., y *Oleiphilus messinenis* ME102 (Figura 4.1.5). Dentro de este grupo se observó un subgrupo formados por varios OTUs relacionados entre sí y con secuencias provenientes exclusivamente de otros estudios independientes del cultivo basados en sedimentos marinos (OTUs #2, 7-10, 12-14, 16-18, y 30, Figura 4.1.5). Una secuencia de la biblioteca EM06 (OTU #31) estuvo relacionada con el grupo de Alcano monooxigenasas AlkM descritas en bacterias del género *Acinetobacter* (Ratajczak, Geissdorfer et al. 1998; Tani, Ishige et al.), las cuales son activas frente a alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> (Throne-Holst, Markussen et al. 2006). El OTU #6 presentó un 85% de identidad (a nivel de la secuencia de aminoácidos) con *Marinobacter* sp. S17-4 (ACT31523), mientras que el resto de los OTUs relacionados a secuencias AlkB de Proteobacteria mostraron identidades en el rango de 51 % a 74 % con secuencias de microorganismos aislados (Tabla 4.1.6). Más aún, las secuencias de las bibliotecas se encontraron más relacionadas con secuencias AlkB provenientes de otros estudios independientes del cultivo (microorganismos aún no cultivados) a partir de sedimentos marinos fríos o suelos de regiones de altas latitudes (Tabla 4.1.6, Figura 4.1.5).



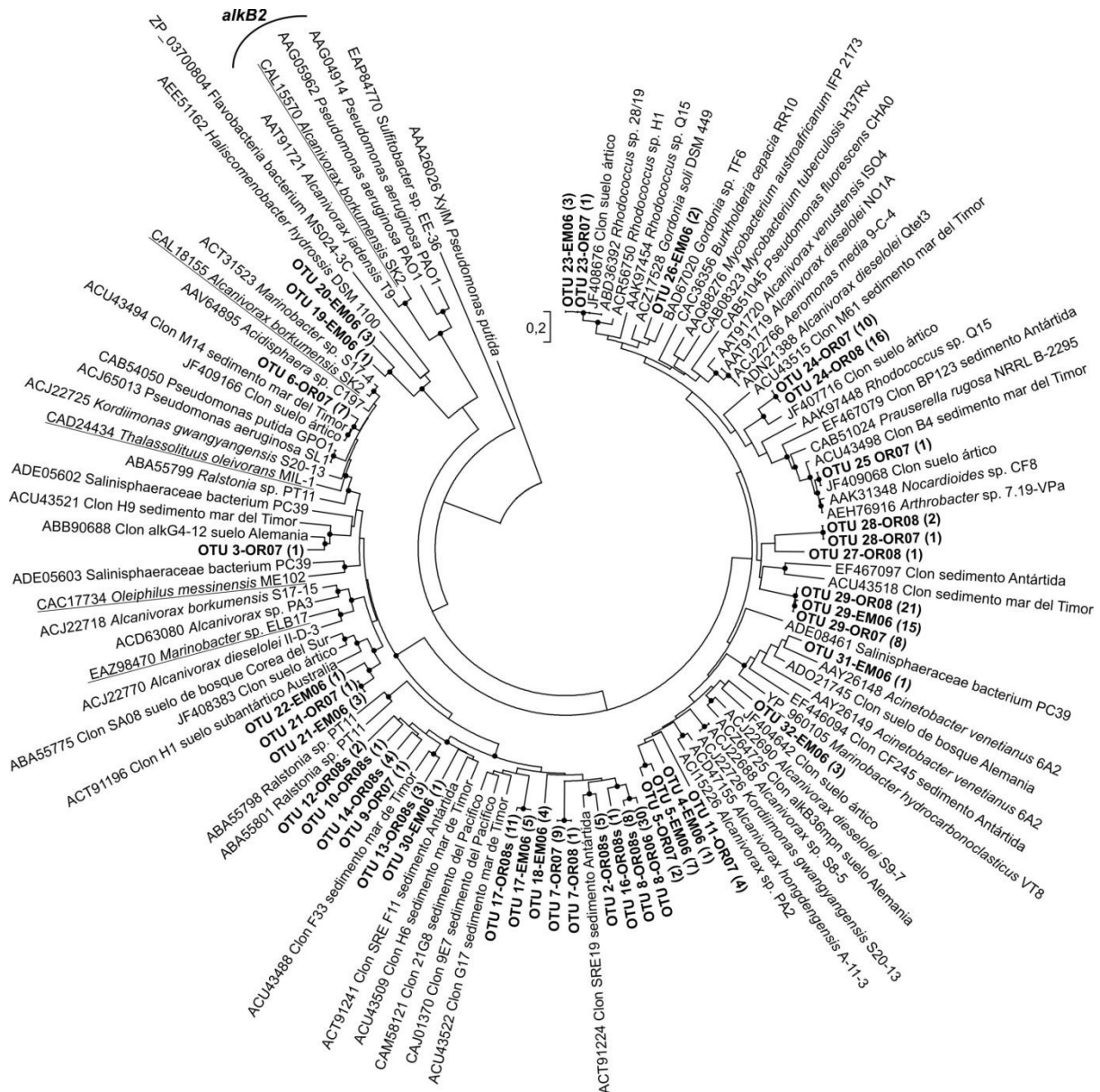
**Figura 4.1.4.** Alineamiento de las secuencias AlkB deducidas a partir de las bibliotecas, y secuencias relacionadas obtenidas de las bases de datos públicas. Se muestra una secuencia representativa por cada OTU. El sitio correspondiente al motivo conservado de histidina II se encuentra subrayado. El comienzo de este motivo no se observa en las secuencias de las bibliotecas, ya que se encuentra en el cebador directo. Los residuos con una identidad y similitud  $\geq 50\%$  se encuentran sombreados en negro y gris, respectivamente.

Las secuencias relacionadas con los genes *alkB* descritos en bacterias del filo Actinobacteria constituyeron el segundo grupo más abundante (33 secuencias, Figura 4.1.5). Dentro de ellas, el OTU más abundante (#24), agrupó con una secuencia proveniente de un clon no cultivado (de una muestra de suelo del Ártico), sin un representante cultivado cercano (Figura 4.1.5). Los otros tres OTUs minoritarios (#23, 25 y 26) mostraron valores altos de identidad con secuencias *AlkB* descritas en bacterias de los géneros *Rhodococcus* y *Arthrobacter* (Tabla 4.1.6). Además, se observaron cuatro secuencias provenientes de la biblioteca de la muestra EM06 que agruparon con secuencias provenientes de miembros del filo Bacteroidetes, formando ramas profundas pero bien soportadas en el árbol filogenético (OTUs 19 y 20, Figura 4.1.5).

**Tabla 4.1.6. Resultados de la comparación, mediante el algoritmo blastp, de las variantes de genes *alkB* identificadas en este estudio, contra la base de datos de proteínas del NCBI.** Los OTUs se ordenaron de acuerdo a su abundancia relativa. Para cada OTU, se indica la secuencia más cercana, y la secuencia más cercana proveniente de un microorganismo aislado, con los números de acceso de la base de datos GenBank entre paréntesis. También se indica el % de identidad (I, al nivel de la secuencia de aminoácidos), el número de secuencias en cada OTU (N), y las muestras donde fue observado el OTU correspondiente.

| OTU | N  | Muestra          | Secuencia significativamente más similar                                 | % I |
|-----|----|------------------|--|-----|
| 29  | 44 | EM06, OR07, OR08 | <i>alkB</i> Clon alkB22CB, suelo de bosque, Baviera, Alemania (ADO21661) | 67  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax dieselolei</i> NO1A (AAT91719)                | 64  |
| 8   | 38 | OR06, OR08s      | <i>alkB</i> Clon SRE-19, sedimento antártico (ACT91224)                  | 73  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55801)                         | 57  |
| 24  | 26 | OR08, OR07       | <i>alkB</i> Clon GO0VNXF07IJMIO, suelo ártico (JF407716)                 | 80  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Gordonia soli</i> DSM 44995 (ACZ17528)                    | 66  |
| 17  | 16 | EM06, OR08s      | <i>alkB</i> Clon G17, sedimento profundo del mar de Timor (ACU43522)     | 70  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Kordiimonas gwangyangensis</i> S20-13 (ACJ22725)          | 58  |
| 7   | 10 | OR07, OR08       | <i>alkB</i> Clon SRE-19, sedimento antártico (ACT91224)                  | 67  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55801)                         | 62  |
| 5   | 9  | EM06, OR07       | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3 (ACD47155)           | 74  |
| 6   | 7  | OR07             | <i>alkB</i> Clon OTU28, suelo (ACB11552)                                 | 93  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Marinobacter</i> sp. S17-4 (ACT31523)                     | 85  |
| 2   | 5  | OR08s            | <i>alkB</i> Clon SRE-19, sedimento antártico (ACT91224)                  | 84  |
|     |    |                  | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i> s17-15 (ACJ22718)             | 62  |
| 23  | 4  | EM06, OR07       | <i>alkB</i> <i>Rhodococcus</i> sp. 28/19 (ABD36392)                      | 100 |
| 11  | 4  | OR07             | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax dieselolei</i> S9-7 (ACJ22690)                | 62  |

|    |   |            |  |    |
|----|---|------------|--|----|
| 14 | 4 | OR08s      | <i>alkB</i> Clon SRE_F11, sedimento antártico (ACT91241)                 | 68 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55798)                         | 55 |
| 18 | 4 | EM06       | <i>alkB</i> Clon G17, sedimento profundo del mar de Timor (ACU43522)     | 72 |
|    |   |            | <i>alkB2</i> <i>Salinisphaeraceae</i> bacterium PC39 (ADE05603)          | 62 |
| 21 | 4 | EM06, OR07 | <i>alkB</i> Clon SA08, suelo de bosque, Uiwang, Corea del Sur (ABA55775) | 67 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax dieselolei</i> 6-D-6 (ACJ22764)               | 59 |
| 13 | 3 | OR08s      | <i>alkB</i> Clon F33, sedimento profundo del mar de Timor (ACU43488)     | 73 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55802)                         | 58 |
| 20 | 3 | EM06       | <i>alkB</i> <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> DSM 1100 (AEE51162)       | 50 |
| 28 | 3 | OR07, OR08 | <i>alkB2</i> <i>Alcanivorax dieselolei</i> Qtet3 (ADN21388)              | 66 |
| 32 | 3 | EM06       | <i>alkB</i> Clon <i>alkB36mpn</i> , suelo, Alemania (ACZ64725)           | 73 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax dieselolei</i> S9-7 (ACJ22690)                | 71 |
| 12 | 2 | OR08s      | <i>alkB</i> Clon 9E7, sedimento del Pacífico (CAJ01370)                  | 64 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55798)                         | 51 |
| 26 | 2 | EM06       | <i>alkB</i> <i>Rhodococcus</i> sp. H1 (ACR56750)                         | 82 |
| 3  | 1 | OR07       | <i>alkB</i> Clon <i>alkG4-12</i> , suelo, Baviera, Alemania (ABB90688)   | 83 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Ralstonia</i> sp. PT11 (ABA55799)                         | 65 |
| 4  | 1 | EM06       | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3 (ACD47155)           | 71 |
| 9  | 1 | OR07       | <i>alkB</i> Clon F33, sedimento profundo del mar de Timor (ACU43488)     | 70 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax</i> sp. PA3 (ACD63080)                        | 55 |
| 10 | 1 | OR08s      | <i>alkB</i> Clon SRE-19, sedimento antártico (ACT91224)                  | 65 |
|    |   |            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SL1 (ACJ65013)                             | 57 |
| 16 | 1 | OR08s      | <i>alkB</i> Clon SRE-19, sedimento antártico (ACT91224)                  | 73 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Marinobacter</i> sp. S17-4 (ACT31523)                     | 66 |
| 19 | 1 | EM06       | <i>alkB</i> <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> DSM 1100 (AEE51162)       | 54 |
| 22 | 1 | EM06       | <i>alkB</i> Clon GO0VNXF07IG6EW, suelo ártico (JF408383)                 | 69 |
|    |   |            | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i> s17-15 (ACJ22718)             | 59 |
| 25 | 1 | OR07       | <i>alkB</i> <i>Arthrobacter</i> sp. 7.19-Vpa (AEH76916)                  | 96 |
| 27 | 1 | OR08       | <i>alkB</i> <i>Alcanivorax venustensis</i> ISO4 (AAT91720)               | 71 |
| 30 | 1 | EM06       | <i>alkB</i> Clon H6, sedimento profundo del mar de Timor (ACU43509)      | 72 |
|    |   |            | <i>alkB1</i> <i>Salinisphaeraceae</i> bacterium PC39 (ADE05602)          | 59 |



66



#### 4.1.2.4 Descripción de la comunidad bacteriana proveniente de la muestra OR08

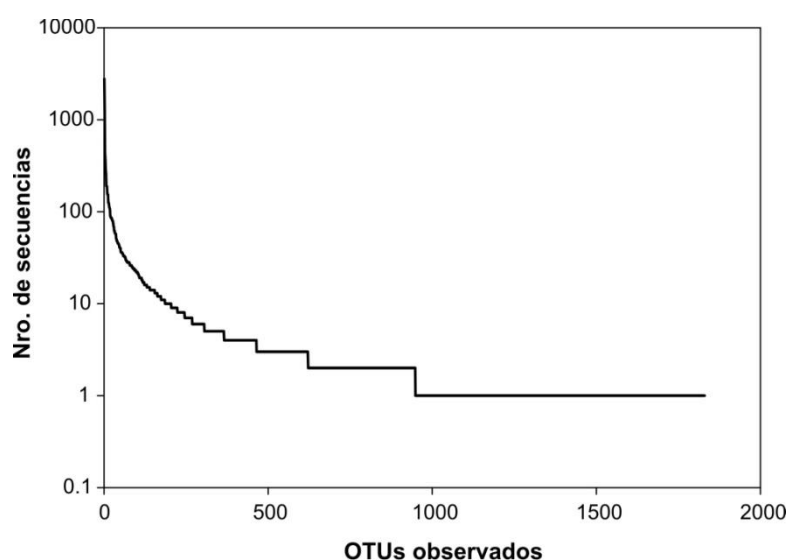
##### 4.1.2.4.1 Análisis de amplicones del gen ARNr 16S

Gracias al desarrollo de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento hoy en día es posible estudiar la estructura de las comunidades microbianas con una profundidad de análisis antes inalcanzable (Sogin, Morrison et al. 2006; Roesch, Fulthorpe et al. 2007). El procedimiento comienza con un paso de amplificación por PCR de un gen biomarcador filogenético. En general se utilizan fragmentos correspondientes a alguna de las regiones hipervariables del gen ARNr 16S, de manera de obtener la máxima información filogenética en un fragmento corto. Luego estos amplicones son secuenciados en forma masiva y en paralelo mediante algunas de las plataformas comerciales de secuenciación de alto rendimiento (454 Roche, Illumina, Life Technologies). Existen dos estrategias ampliamente utilizadas para analizar las secuencias parciales del gen ARNr obtenidas. Una de ellas se basa en la clasificación de las secuencias en grupos taxonómicos, siguiendo una taxonomía de referencia basada en genes ARNr 16S de microorganismos conocidos (Wang, Garrity et al. 2007; Huse, Dethlefsen et al. 2008; Liu, DeSantis et al. 2008). La principal limitación de este método reside en que las taxonomías de referencia no pueden resolver adecuadamente la clasificación de secuencias novedosas de microorganismos no cultivados, o de grupos poco representados en las bases de datos, sumado al hecho de que tampoco existe una definición consensuada de especie bacteriana (Schloss and Westcott 2011).

La segunda estrategia, en cambio, se basa en dejar que los datos “hablen por sí mismos”, y consiste en agrupar las secuencias en Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) de acuerdo a un dado grado de identidad entre ellas (Schloss and Handelsman 2005; Schloss, Westcott et al. 2009; Sun, Cai et al. 2009; Schloss and Westcott 2011). En la mayoría de los trabajos con secuencias parciales del gen ARNr 16S, se utiliza un 97% de identidad como criterio de agrupamiento (distancia 0,03). De acuerdo a los valores de identidad promedio compartida entre microorganismos del mismo género, los OTUs definidos a esta distancia podrían ser considerados como indicativos de poblaciones bacterianas al nivel de género y/o sub-género (Schloss and Westcott 2011).

En este trabajo, se realizó la pirosecuenciación por 454 Roche de la región variable V4 del gen ARNr 16S (Instituto de Agrobiotecnología de Rosario, INDEAR), a partir de la muestra OR08, con el fin de obtener un perfil en profundidad de la estructura general de la comunidad bacteriana característica de un ambiente costero subantártico, y evaluar la presencia de géneros asociados a la degradación de alcanos. Se obtuvieron un total de 16.837 secuencias, de las cuales se conservaron 15.344 luego de los filtros aplicados (secuencias de baja calidad, quimeras, y

secuencias no asignadas al dominio Bacteria; ver Sección 3.10, Materiales y Métodos). Estas secuencias presentaron una longitud de 225 pb en promedio. El análisis mediante agrupamiento en OTUs al 97% de identidad mostró una alta diversidad bacteriana, con 1.829 OTUs observados ( $S_{obs}$ ), y 3.011 OTUs estimados mediante el índice *Chao1* (intervalo de confianza del 95%: 2.817-3.243). Se observa una mayor proporción de OTUs formados por menos de 10 secuencias, y muchos de ellos formados por una secuencia (*singletons*) (Figura 4.1.6). Asimismo, se obtuvo una cobertura del 94%, la cual si bien es alta y nos permite una gran profundidad de análisis, sugiere que de seguir muestreando (con el análisis de más secuencias) probablemente se observarían nuevos OTUs.



**Figura 4.1.6.** Número de secuencias para cada OTU observado en OR08. El eje vertical (y) se encuentra en escala logarítmica. Se observa una mayor proporción de OTUs formados por menos de 10 secuencias, y muchos de ellos formados por una secuencia (*singletons*).

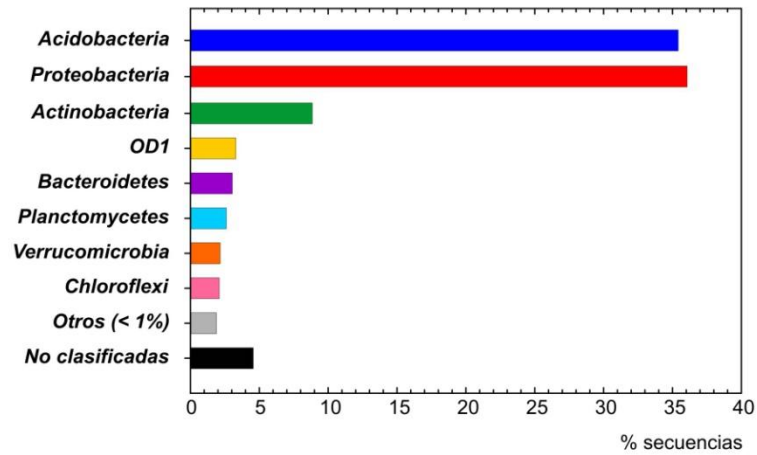
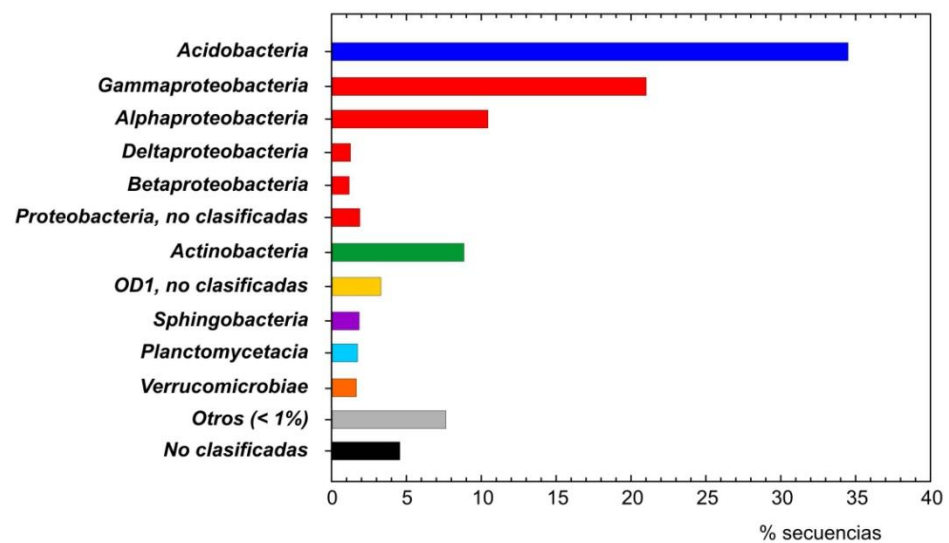
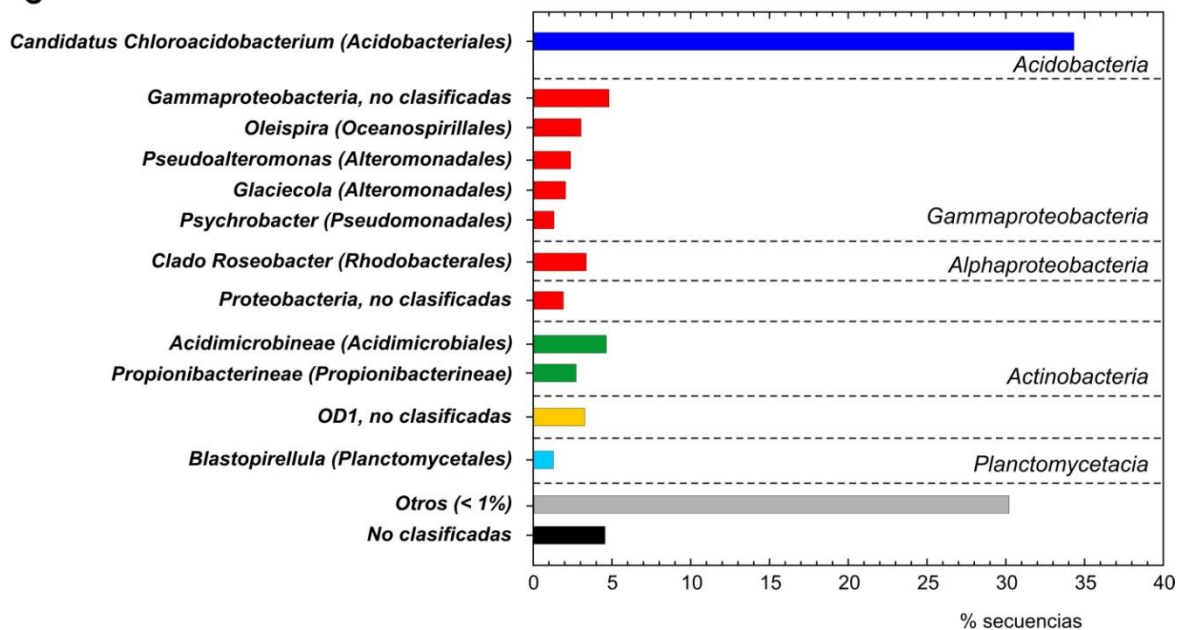
Mediante la comparación de las lecturas obtenidas con la base de datos de genes ARN ribosomales SILVA (Quast, Pruesse et al. 2013), se pudieron identificar 26 filos bacterianos en OR08, siendo algunos filos predominantes, y la mayoría de ellos (18) con frecuencias observadas menores al 1%. Los tres filos más abundantes fueron Proteobacteria (36,1% del total de secuencias), Acidobacteria (35,4% del total de secuencias), y Actinobacteria (8,9% del total de secuencias); mientras que un 4,6% de las secuencias no pudieron ser asignadas al nivel de filo (Figura 4.1.7 A). Las secuencias no clasificadas probablemente correspondan a organismos aun no cultivados y no representados en la base de datos utilizada. Estos resultados agregan evidencia al hecho de que gran parte de la diversidad microbiana se encuentra aun inexplorada, y

se necesitan estudios en esta dirección para dilucidar el rol que juegan estos grupos en el ecosistema (Wang, Liu et al. 2013).

Las clases Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria fueron las más abundantes dentro del filo Proteobacteria (21,0% y 10,5%, respectivamente). La clase Acidobacteria fue dominante entre las Acidobacterias (34,5%), mientras que la clase Actinobacteria fue la más abundante dentro del filo Actinobacteria (8,9%) (Figura 4.1.7 B).

Analizamos los principales géneros observados en OR08 y su relación con la biodegradación de hidrocarburos. Se observaron varios géneros abundantes para los cuales se conocen sus capacidades degradativas, como ser *Oleispira* (3,0%) (Yakimov, Giuliano et al. 2003), y *Pseudoalteromonas* (2,4%) (Hedlund and Staley 2006). Dentro de la clase Alphaproteobacteria, un 3,4% de las secuencias fueron clasificadas como pertenecientes al clado Roseobacter, donde se encuentran bacterias con la capacidad de utilizar compuestos aromáticos (Buchan, Gonzalez et al. 2005). Además, dentro de la clase Actinobacteria (suborden Propionibacterineae), se observó el género *Nocardioides* (1,8%), el cual posee cepas con la capacidad para degradar alcanos y compuestos poliaromáticos de bajo peso molecular (Hamamura and Arp 2000). Otros géneros abundantes fueron *Glaciecola* (2,1%), y *Psychrobacter* (1,3%), microorganismos psicrófilos que han sido reportados asociados a la biodegradación de hidrocarburos en estudios independientes del cultivo (Deppe, Richnow et al. 2005; Harwati, Kasai et al. 2007; Prabakaran, Manorama et al. 2007; Brakstad, Nonstad et al. 2008), si bien hasta el momento no se han caracterizado aislamientos que presenten dicha capacidad (Figura 4.1.7 C).

Por otro lado, un 1,3% de las secuencias fueron clasificadas como pertenecientes al género *Blastopirellula* (clase Planctomycetacia). Dentro del filo Acidobacteria, las secuencias clasificadas como *Candidatus Chloroacidobacterium* fueron muy abundantes en OR08 (34,33%).

**A****B****C**

**Figura 4.1.7.** Frecuencias relativas de los principales filos (A) y clases (B), y géneros (C) de la comunidad bacteriana de OR08, observados mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S. La longitud de las barras mostradas corresponde al porcentaje de lecturas clasificadas en cada categoría. Se indican solamente las categorías con abundancias relativas

>1%. La categoría “Otros” corresponde a la suma de los valores observadas de las categorías con abundancias relativas < 1%. La categoría “No clasificadas” corresponde a las secuencias no clasificadas al nivel de filo.

Recientemente, en un trabajo realizado en el LMA, se definió un índice ecológico de exposición a hidrocarburos (EIHE, *ecological index of hydrocarbon exposure*), el cual reflejaría en teoría la proporción de la comunidad bacteriana con el potencial de degradar hidrocarburos. Este índice se obtiene mediante el cálculo de la sumatoria de las abundancias relativas de los diferentes géneros asociados a la biodegradación, seleccionados *a priori*, basándose en datos de secuenciación en gran escala de amplicones del gen ARNr 16S (Lozada, Marcos et al. 2014). A partir de los datos de secuenciación presentados en este capítulo, calculamos el valor de este índice para la muestra OR08 (Tabla 4.1.7). El mismo fue de 13,9, lo cual se interpreta en el sentido de que más de un 10% de la comunidad bacteriana de estos sedimentos está compuesta por géneros potencialmente asociados a la biodegradación de hidrocarburos.

**Tabla 4.1.7. Cálculo del índice EIHE para la muestra OR08.** Se indican los géneros y sus abundancias relativas utilizados para el cálculo del índice.

| Género                 | Abundancia relativa<br>(% de lecturas totales) | Género                   | Abundancia relativa (% de<br>lecturas totales) |
|------------------------|--|--------------------------|--|
| <i>Mycobacterium</i>   | 0,01   | <i>Marinobacter</i>      | 0,05   |
| <i>Nocardioides</i>    | 1,85   | <i>Microbulbifer</i>     | 0,01   |
| <i>Flavobacterium</i>  | 0,02   | <i>Pseudoalteromonas</i> | 2,38   |
| <i>Roseobacter</i>     | 3,36   | <i>Shewanella</i>        | 0,05   |
| <i>Sulfitobacter</i>   | 0,48   | <i>Alcanivorax</i>       | 0,07   |
| <i>Roseovarius</i>     | 0,94   | <i>Oleispira</i>         | 3,04   |
| <i>Sulfitobacter</i>   | 0,05   | <i>Oleiphilus</i>        | 0,20   |
| <i>Novosphingobium</i> | 0,19   | <i>Acinetobacter</i>     | 0,06   |
| <i>Sphingopyxis</i>    | 0,61   | <i>Pseudomonas</i>       | 0,35   |
| <i>Comamonas</i>       | 0,01   | <i>Vibrio</i>            | 0,2  |
| <i>Polaromonas</i>     | 0,01   | <b>Índice EIHE</b>       | <b>13,94</b>                                   |

#### 4.1.3 DISCUSIÓN

En este capítulo utilizamos dos enfoques para caracterizar la diversidad de poblaciones bacterianas con el potencial de degradar hidrocarburos alifáticos presentes en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia. Por un lado, utilizamos el marcador funcional *alkB*, que codifica para

el componente catalítico del complejo Alcano hidroxilasa. Este complejo multienzimático es responsable de iniciar una de las vías de degradación aeróbica de alcanos de cadena media (C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>) y se encuentra ampliamente distribuido en bacterias degradadoras de ambientes terrestres, de agua dulce y marinos (Wang and Shao 2013; Nie, Chi et al. 2014). El uso de genes marcadores funcionales presenta la ventaja de proporcionar información directa sobre el potencial de la comunidad microbiana para degradar los compuestos de interés. Por otro lado, mediante el uso de marcadores filogenéticos se pueden detectar géneros para los cuales aún no se conocen los genes degradativos (Lozada, Marcos et al. 2014). Como marcador filogenético utilizamos fragmentos del gen ARNr 16S, obtenidos mediante secuenciación en gran escala.

Los resultados de este estudio muestran la existencia de una gran diversidad de genes *alkB* en los sedimentos del ambiente crónicamente contaminado de Bahía Ushuaia, los cuales reciben aportes pequeños y constantes de derivados refinados del petróleo (Esteves, Commendatore et al. 2006; Commendatore, Nievas et al. 2012). Los OTUs más abundantes se observaron en muestras de diferentes sitios u obtenidas a lo largo de diferentes años, lo que sugiere la relevancia ecológica de las poblaciones bacterianas que contienen estas variantes *alkB* (OTUs #29, 8, 24 y 17, Figura 4.1.5). En general, las variantes *alkB* observadas fueron más similares a secuencias provenientes de organismos no cultivados, en concordancia con otros estudios de ambientes costeros y marinos profundos poco explorados (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009). Las secuencias más frecuentemente encontradas en las búsquedas de similitud (*blastp*) fueron detectadas en sedimentos marinos de la Antártida contaminados con diesel (número de acceso de Genbank ACT91224 y secuencias relacionadas), muestras de suelos del Ártico contaminados con combustible (Bell, Yergeau et al. 2011), y sedimentos marinos profundos bajo la influencia de filtraciones naturales de petróleo (Wasmund, Burns et al. 2009). Una excepción fueron los OTUs #23, 25 y 26, que presentaron altos valores de identidad con aislamientos del filo Actinobacteria (Figura 4.1.5). Varias de las secuencias amplificadas a partir de sedimentos de Bahía Ushuaia formaron parte de un grupo monofilético amplio y diverso, donde por ejemplo se encuentran Alcano monooxigenasas de diferentes Gammaproteobacterias hidrocarbonoclásticas, como ser *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Thalassolituus oleivorans* MIL-1, *Marinobacter* sp., y *Oleiphilus messinensis* ME102 (Yakimov, Golyshin et al. 1998; Golyshin, Chernikova et al. 2002; Yakimov, Giuliano et al. 2004) (Figura 4.1.5).

La pirosecuenciación 454 de amplicones del gen ARNr 16S nos permitió determinar en profundidad la estructura de la comunidad bacteriana de la muestra de sedimento intermareal OR08, observándose la presencia de algunos grupos dominantes y una gran cantidad de poblaciones poco abundantes (Figuras 4.1.6 y 4.1.7). En concordancia con la detección de

secuencias *alkB* relacionadas con miembros del filo Proteobacteria, los miembros de las clases Alpha-, Beta-, Delta-, y Gammaproteobacteria estuvieron dentro de los grupos predominantes mediante el análisis de los resultados de la pirosecuenciación 454 (Figura 4.1.7). Los filos observados en OR08 (Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi y Bacteroidetes) son los reportados comúnmente como dominantes en ambientes marinos (Li, Yu et al. ; Zinger, Amaral-Zettler et al. 2011; Wang, Liu et al. 2013; Zhu, Tanabe et al. 2013). Sin embargo, existen diferencias con respecto a las abundancias relativas observadas. Por ejemplo, mientras la predominancia del filo Proteobacteria se ha observado en comunidades bacterianas marinas provenientes de sedimentos de diferentes profundidades, las Acidobacterias se han observado en menor proporción (Zinger, Amaral-Zettler et al. 2011; Wang, Liu et al. 2013; Zhu, Tanabe et al. 2013), por lo cual resulta llamativo que para OR08 el filo Acidobacteria se observó en una proporción similar al filo Proteobacteria. Las Acidobacterias son miembros ubicuos y abundantes de las comunidades bacterianas del suelo, con unas pocas cepas descriptas, y también se han reportado en sedimentos de aguas dulces (*freshwater sediments*) (Quaiser, Ochsenreiter et al. 2003). Por lo tanto, la presencia de Acidobacterias podría deberse a los aportes de agua dulce que reciben los sedimentos de Bahía Ushuaia desde el continente (Amin, Comoglio et al. 2010).

En este trabajo se detectó la presencia de concentraciones moderadas de hidrocarburos alifáticos en los sedimentos de Bahía Ushuaia. Asimismo, los índices de diagnóstico analizados evidenciaron que existen procesos de biodegradación de hidrocarburos en marcha en estos sedimentos. Interesantemente, varios de los géneros predominantes observados en OR08 corresponden a microorganismos con la capacidad de degradar hidrocarburos a bajas temperaturas, o que se han visto asociados (en estudios independientes del cultivo) a la biodegradación. Por ejemplo, dentro de la clase Gammaproteobacteria, se observaron los géneros *Oleispira*, *Pseudoalteromonas*, *Glaciecola* y *Psychrobacter* (Figura 4.1.7 C). Los miembros del género *Oleispira* pertenecen al grupo de bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas. Fueron considerados sólo psicrófilos inicialmente (Yakimov, Giuliano et al. 2003), aunque luego se identificó un aislamiento con una temperatura óptima de crecimiento de 28 °C (Wang, Yu et al. 2012). Poseen la capacidad de degradar alcanos, y recientemente se secuenció el genoma de *Oleispira antarctica*, donde se identificaron tres genes codificantes para alcano monooxigenasas AlkB (Kube, Chernikova et al. 2013). Ninguna de las secuencias *alkB* identificadas en los sedimentos de Bahía Ushuaia se encontró relacionada con dichas alcano monooxigenasas de *Oleispira antarctica* (resultados no mostrados), por lo tanto, el tipo de *Oleispira* observado en OR08 podría ser diferente a los aislamientos de *Oleispira antarctica* caracterizados hasta el

momento. Alternativamente, las secuencias *alkB* de *Oleispira* podrían no haber sido recuperadas en las bibliotecas *alkB* construidas en nuestro estudio, debido a desvíos asociados a los cebadores utilizados, y/o al paso de clonado, entre otros (Forney, Zhou et al. 2004).

Las bacterias del género *Pseudoalteromonas* frecuentemente se encuentran en asociación con huéspedes eucariotas en el ambiente marino, y además muestran diferentes actividades biológicas extracelulares, como ser actividades anti-bacterianas, bacteriolíticas, agarolíticas y alguicidas (Holmström and Kjelleberg 1999). Asimismo, se han obtenido aislamientos de este género a partir de ambientes marinos fríos (Bozal, Tudela et al. 1997; Al Khudary, Stosser et al. 2008; Piette, D'Amico et al. 2012). Poseen la capacidad de degradar hidrocarburos poliaromáticos de bajo peso molecular (Hedlund and Staley 2006), y representantes de este género también se observaron como parte de un consorcio microbiano con la capacidad de degradar petróleo crudo a 4 °C (Deppe, Richnow et al. 2005). Las bacterias de los géneros *Glaciecola* y *Psychrobacter* son microorganismos psicrófilos que han sido reportados asociados a la biodegradación de hidrocarburos en estudios independientes del cultivo (Deppe, Richnow et al. 2005; Harwati, Kasai et al. 2007; Prabakaran, Manorama et al. 2007; Brakstad, Nonstad et al. 2008), incluyendo un estudio con agua de mar de Ushuaia y agua de mar contaminada con la fracción hidrosoluble del petróleo crudo (Prabakaran, Manorama et al. 2007). Prabakaran y colaboradores también reportaron la abundancia de clones con secuencias de genes para el ARNr 16S relacionados al clado Roseobacter (Alphaproteobacteria), otro grupo abundante observado en OR08 (Figura 4.1.7 C). El clado Roseobacter es un linaje frecuentemente encontrado en diversos ambientes marinos, donde llevan a cabo procesos biogeoquímicos críticos (Buchan and González 2010). Mediante técnicas independientes del cultivo, se observó que es uno de los grupos que proliferan en experimentos controlados de exposición a hidrocarburos (enriquecimientos con petróleo crudo (Brakstad and Lodeng 2005; Coulon, McKew et al. 2007), gasoil (Lanfranconi, Bosch et al. 2010), o alcanos (McKew, Coulon et al. 2007)).

Dentro de la clase Actinobacteria, se observó el género *Nocardioides*, el cual posee cepas con la capacidad para degradar alcanos y compuestos poliaromáticos de bajo peso molecular (Hamamura and Arp 2000). Las poblaciones bacterianas del género *Nocardioides*, junto con otras Actinobacterias que no pudieron ser clasificadas hasta el nivel de género (Figura 4.1.7 C) podrían estar hospedando las variantes *alkB* correspondientes a los OTUs #24 y 25, relacionadas con miembros del filo Actinobacteria (Figura 4.1.5).

Otro de los géneros observados fue *Blastopirellula*, dentro del filo Planctomycetes (Figura 4.1.7 C). Los miembros de este filo se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente



marino, donde se ha sugerido que utilizan heteropolisacáridos sulfatados complejos como fuente de carbono y energía (Glockner, Kube et al. 2003; Woebken, Teeling et al. 2007). En cuanto a su relación con la degradación de hidrocarburos, el único estudio corresponde al trabajo de Pereira y colaboradores, donde observaron que siete aislamientos del filo Planctomycetes fueron capaces de crecer en presencia de diferentes mezclas de hidrocarburos (diesel, gasolina sin plomo, petróleo, aceite de turbinas, fueloil y tolueno) (Pereira, Terenziani et al. 2010).

A partir de los datos de asignación taxonómica de las secuencias se calculó el Índice Ecológico de Exposición a Hidrocarburos (Ecological Index of Hydrocarbon exposure, EIHE, (Lozada, Marcos et al. 2014)) para la muestra OR08. Este índice se compone de las abundancias relativas de los diferentes géneros asociados a la biodegradación (seleccionados a priori en base a la literatura). Dada la enorme complejidad de las comunidades naturales, estos valores muchas veces son pequeños, y sólo pueden ser calculados a partir de datos basados en técnicas de alta cobertura como la secuenciación en gran escala. El EIHE es indicativo del grado de exposición a hidrocarburos de la muestra en estudio, ya que se observó una relación directa entre el valor del índice y el estado ambiental de las muestras analizadas, para muestras del ambiente marino incluyendo agua, y sedimentos tanto a campo como en sistemas experimentales. Las muestras contaminadas presentaban valores altos del índice ( $> 5$ ), mientras que los sitios no impactados presentaban valores no mayores a 1-2 (Lozada, Marcos et al. 2014). Nuestros resultados, con un índice mayor a 10, sugieren que en los sedimentos de Planta Orión se estableció una comunidad altamente adaptada a la contaminación, y por lo tanto capaz de responder rápidamente a la exposición a estos contaminantes.

En conclusión, varios componentes, incluyendo el tipo de contaminación y factores ambientales como la temperatura estarían ejerciendo una influencia en las poblaciones bacterianas con el potencial de degradar hidrocarburos alifáticos. Se necesitan estudios en esta dirección con el fin de evaluar cuantitativamente la contribución relativa de los diferentes factores ambientales a la estructuración de los grupos bacterianos degradadores de hidrocarburos en el ambiente marino. Los índices de diagnóstico analizados evidenciaron que existen procesos de biodegradación de hidrocarburos en marcha en los sedimentos de Bahía Ushuaia, y los dos enfoques independientes del cultivo utilizados nos permitieron identificar poblaciones bacterianas potencialmente involucradas, y construir hipótesis a partir de su estructura. En el capítulo siguiente evaluaremos la hipótesis propuesta, analizando la respuesta de estas poblaciones autóctonas y de la comunidad en general, luego de una exposición a petróleo crudo en condiciones controladas de laboratorio.

## 4.2 CAPÍTULO 2: CAMBIOS EN LA COMUNIDAD BACTERIANA PROVENIENTE DE UNA MUESTRA DE SEDIMENTO COSTERO DE BAHÍA USHUAIA FRENTE A LA EXPOSICIÓN A PETRÓLEO CRUDO

### 4.2.1 INTRODUCCIÓN

El petróleo crudo es quizás una de las mezclas más complejas de compuestos orgánicos, pudiendo contener entre 10.000 y 100.000 compuestos químicos diferentes dependiendo de su tipo u origen (Marshall and Rodgers 2004). Dentro de esta complejidad, los componentes químicos pueden clasificarse en cuatro grupos principales: los hidrocarburos saturados, los hidrocarburos aromáticos, y los componentes más polares, la resinas y los asfaltenos (Head, Jones et al. 2006).

El petróleo liberado en el medio ambiente pasa por una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, que en conjunto se denominan intemperización (*weathering*). Durante la etapa temprana de un derrame, los procesos más significativos son la difusión, evaporación, dispersión, emulsificación y disolución. Luego, actúan los procesos a largo plazo que determinarán el destino final del petróleo derramado: fotooxidación, sedimentación y biodegradación (Lozada, Marcos et al. 2014). La biodegradación por poblaciones naturales de microorganismos es en última instancia el principal mecanismo de eliminación de estos contaminantes del medio ambiente (Prince, Gramain et al. 2010). Por lo tanto, el conocimiento de los microorganismos con estas capacidades metabólicas puede ser aplicado en el desarrollo de estrategias de monitoreo ambiental, y también a lo largo de todas las instancias de un proceso de biorremediación. La biorremediación, definida como la utilización de sistemas biológicos para la detoxificación o remoción de contaminantes del medio ambiente, es considerada de gran potencial por su bajo costo relativo y menor impacto para el ecosistema en comparación con otros métodos. Existen dos enfoques principales con el fin de acelerar las velocidades naturales de degradación: (a) el agregado de bacterias degradadoras conocidas (*bioaumentación*), y (b) el agregado de nutrientes o de otros co-sustratos limitantes del crecimiento a fin de promover el desarrollo de los microorganismos degradadores autóctonos (*bioestimulación*) (Das and Chandran 2011). Por ejemplo, se han desarrollado fertilizantes de liberación progresiva de nitrógeno (N) y fósforo (P), con propiedades hidrofóbicas para adherirse a la superficie del petróleo, que han sido aplicados exitosamente en la limpieza de playas contaminadas (Rosenberg, Legman et al. 1996; Atlas and Hazen 2011). Sin embargo aún queda mucho por conocer con respecto a la biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente marino (Ron and Rosenberg).

Asimismo, es importante tener presente que las bacterias degradadoras de hidrocarburos no actúan de manera aislada en la naturaleza, sino que forman parte de una red ecológica que involucra diferentes interacciones directas e indirectas con otros miembros de la comunidad y el medio ambiente. Estas interacciones incluyen, por ejemplo, la competencia por los nutrientes limitantes, predación por protozoos, lisis por fagos, e interacciones cooperativas que favorecen la degradación, tal como la liberación de biosurfactantes por algunas poblaciones los cuales son aprovechados por otras (Head, Jones et al. 2006; McGenity, Folwell et al. 2012). Por otro lado, los sedimentos constituyen un sistema con sus particularidades, derivadas de la interacción de microorganismos y sustancias con la matriz, y de la presencia de micronichos con disponibilidad de diferentes aceptores de electrones (Cravo-Laureau and Duran 2014). Las herramientas moleculares están demostrando ser fundamentales para el avance de la comprensión del rol de los diferentes microorganismos en el proceso de biodegradación, por ejemplo a partir del derrame ocurrido en el golfo de México (Yang, Nigro et al. 2014). El estudio de los ecosistemas marinos con herramientas apropiadas para su nivel de complejidad permitirá llegar en última instancia a un manejo de los mismos que permita optimizar sus capacidades degradativas (Rolling and van Bodegom 2014).

Los resultados del capítulo anterior sugerían que los sedimentos de Planta Orión (Bahía Ushuaia) poseen una comunidad bacteriana adaptada a la presencia de hidrocarburos derivados del petróleo, y por lo tanto, con la capacidad de responder rápidamente frente a una nueva exposición a estos contaminantes. En este capítulo nos propusimos evaluar la respuesta a corto plazo de la comunidad bacteriana de OR08 y de las poblaciones portadoras de genes *alkB*, frente a una exposición a petróleo crudo en condiciones controladas de laboratorio. Estos sistemas experimentales, a pesar de ser representaciones altamente simplificadas de la realidad, son necesarios durante las primeras etapas de estudios ambientales o ecológicos ya que al poder controlar las variables que afectan la respuesta del objeto de estudio, es posible realizar inferencias sobre procesos altamente complejos, como es el caso de la biodegradación de mezclas de hidrocarburos por comunidades bacterianas naturales.

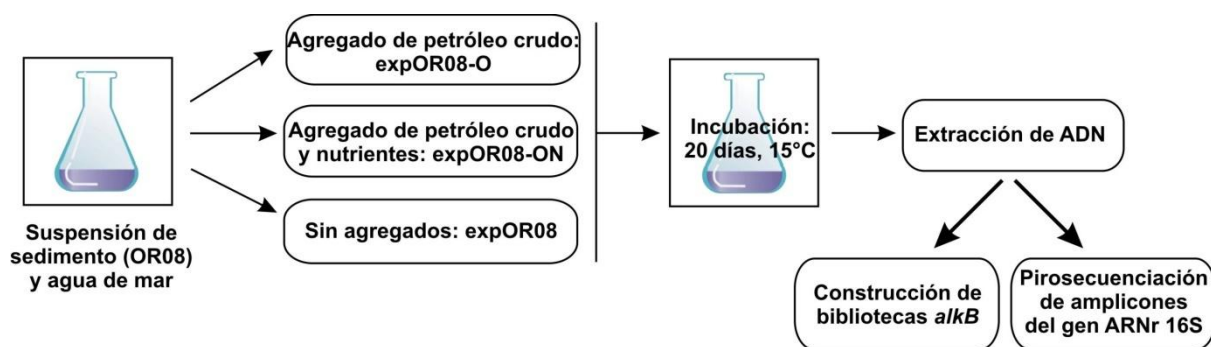
#### 4.2.2 RESULTADOS

##### 4.2.2.1 Experimentos de exposición a petróleo crudo y de bioestimulación

Se construyeron sistemas experimentales a escala de laboratorio utilizando una parte de sedimento intermareal (muestra de Planta Orión del año 2008, OR08) y dos partes de agua de mar (Sección 3.6 Materiales y Métodos). Las tres condiciones fueron:

- (1) expOR08: condición sin el agregado de petróleo crudo o nutrientes,
- (2) expOR08-O: agregado de petróleo crudo,
- (3) expOR08-ON: agregado de petróleo crudo junto con nitrógeno y fósforo.

Estos experimentos fueron incubados en oscuridad con agitación (150 rpm) a una temperatura constante de 15° C durante 20 días, luego de lo cual se tomaron muestras que fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis. El efecto de los distintos tratamientos se evaluó a nivel de la estructura de la comunidad bacteriana mediante secuenciación en gran escala de la región hipervariable V4 del gen ARNr 16S (Instituto de Agrobiotecnología de Rosario). Además, se analizaron los cambios en las poblaciones degradadoras de alcanos mediante la construcción de bibliotecas de fragmentos de amplificación de genes *alkB* (Figura 4.2.1).



**Figura 4.2.1. Construcción y análisis de sistemas experimentales de sedimento y agua de mar.**

#### 4.2.2.1.1 Biodegradación de alcanos

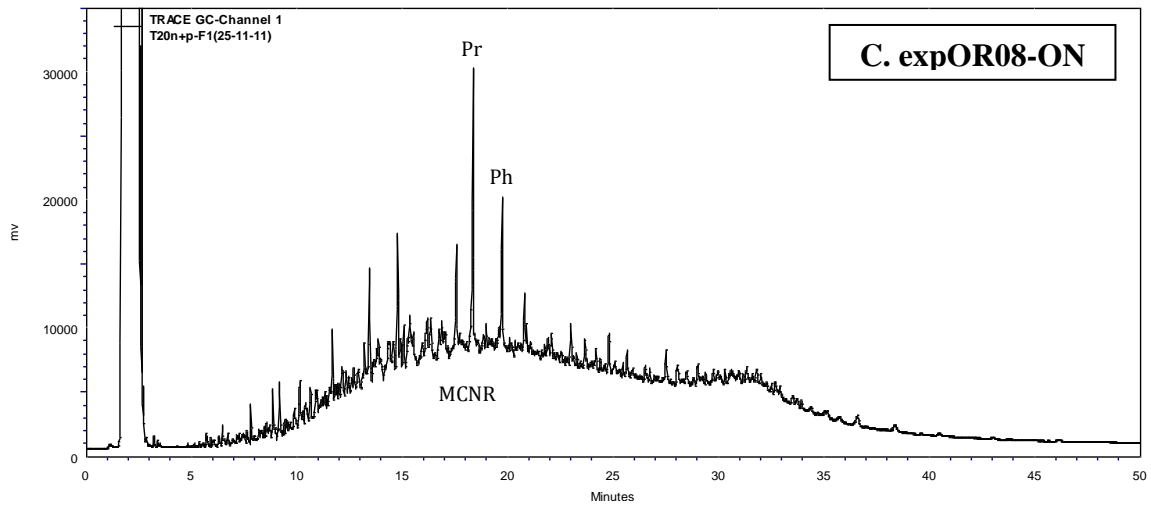
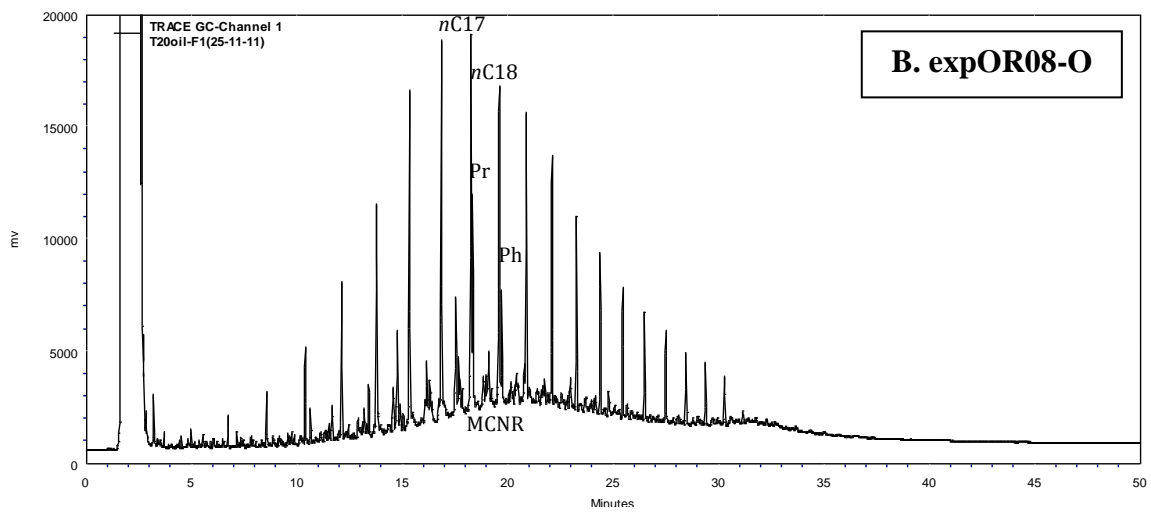
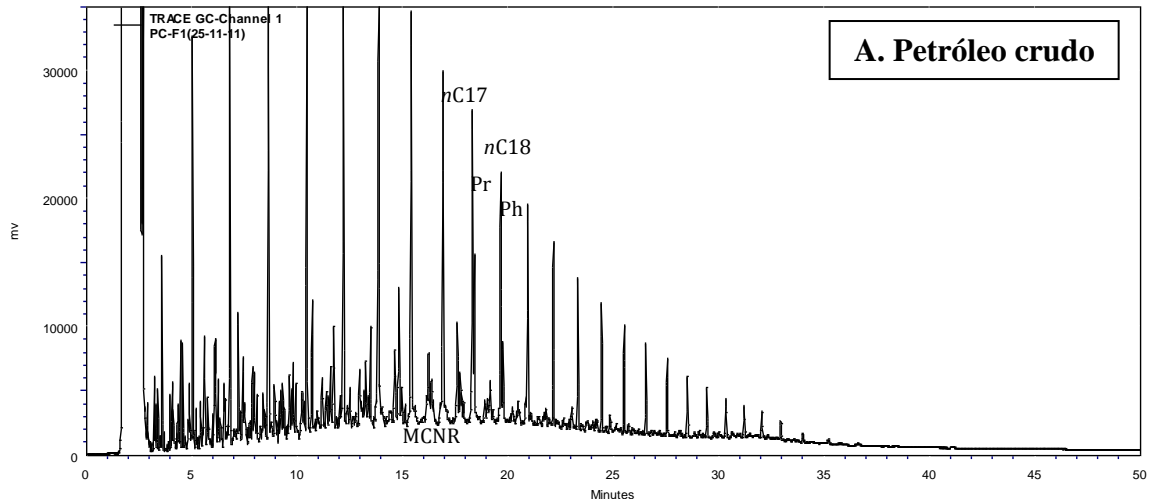
Al analizar los perfiles cromatográficos correspondientes al petróleo crudo agregado y al sistema experimental expOR08-O, observamos que luego de 20 días de tratamiento, ocurrió una disminución en la concentración relativa de *n*-alcanos de longitud menor a 20 carbonos (Figura 4.2.2). Esta disminución se extendió a la mayoría de los alcanos resueltos en el caso del sistema con petróleo crudo y nutrientes (expOR08-ON), observándose en el perfil cromatográfico el aumento de la “joroba” correspondiente a la mezcla compleja no resuelta (MCNR), y la disminución de los picos correspondientes a los alcanos de diferentes pesos moleculares (Figura 4.2.2 C). Estos resultados también se evidencian en la disminución de los valores de los índices *n*-C17/Pr, *n*-C18/Fi, y ART/MCNR, al comparar los sistemas experimentales expOR08-O y expOR08-ON con el petróleo crudo agregado (Tabla 4.2.1). Los valores más bajos de estos índices se observaron en el sistema experimental expOR08-ON (Tabla 4.2.1). Estos índices se

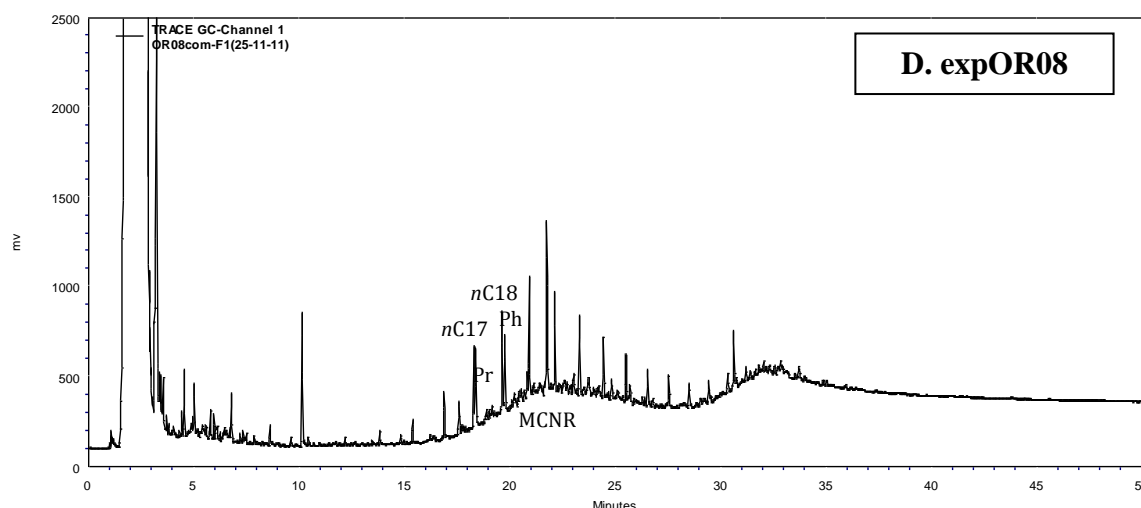
utilizan para evaluar el grado relativo de biodegradación de *n*-alcanos, y valores bajos de los mismos indican la presencia de un proceso de degradación (Commendatore and Esteves 2004). Otro índice utilizado fue la relación entre los alcanos de bajo peso molecular y los alcanos de alto peso molecular (BPM/APM), como estimación de la biodegradación relativa de compuestos más livianos durante los experimentos. También observamos que este índice disminuye para los sistemas experimentales expOR08-O y expOR08-ON con respecto al petróleo crudo agregado (Tabla 4.2.1). Estos resultados indican que, luego de 20 días de exposición, ocurrió un cierto grado de biodegradación en el sistema expOR08-O, y que este proceso fue más eficiente con el agregado de nutrientes (expOR08-ON).

**Tabla 4.2.1 Índices de diagnóstico calculados para el sedimento original OR08 y los sistemas experimentales correspondientes.**

| Muestra                 |            | Índices de diagnóstico |                  |          |           |
|-------------------------|------------|------------------------|------------------|----------|-----------|
| Tipo                    | Nombre     | <i>n</i> -C17/Pr       | <i>n</i> -C18/Fi | ART/MCNR | BPM/APM   |
| Sedimento               | OR08       | 1,19                   | 1,43             | 0,21     | <i>na</i> |
| Petróleo crudo          | O          | 2,17                   | 3,18             | 0,76     | 4,09      |
| Sistemas experimentales | expOR08    | 1,00                   | 1,20             | 0,16     | <i>na</i> |
|                         | expOR08-O  | 1,99                   | 2,82             | 0,41     | 2,34      |
|                         | expOR08-ON | 0,02                   | 0,20             | 0,12     | 0,78      |

*na*: no aplicable. Pr: pristano. Fi: fitano. ART: Alifáticos resueltos totales. MCNR: Mezcla compleja no resuelta. BPM: *n*-alcanos de bajo peso molecular (de longitud menor o igual a 20 carbonos). APM: *n*-alcanos de alto peso molecular (de longitud mayor o igual a 21 carbonos).





**Figura 4.2.2.** Perfiles obtenidos mediante cromatografía de gases de alta resolución de la fracción de hidrocarburos alifáticos correspondientes al petróleo crudo agregado (A), y a los sistemas experimentales luego de 20 días de tratamiento (B-D). Se indican los picos correspondientes a los alcanos de 17 (*n*C17) y 18 (*n*C18) carbonos, y los isoprenoides pristano (Pr) y fitano (Fi). MCNR: mezcla compleja no resuelta. La MCNR comprende una serie de compuestos como cicloalcanos, alcanos ramificados y otros compuestos no resueltos por la columna capilar y eluyen como una montaña por debajo de los compuestos resueltos.

#### 4.2.2.1.2 Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana

Conocer la estructura de una comunidad bacteriana significa conocer la identidad de los miembros individuales que la componen y su abundancia (Little, Robinson et al. 2008). Otra propiedad de las comunidades bacterianas es la diversidad, un concepto proveniente de la macroecología, y que comprende dos aspectos: la *riqueza* de especies (número de especies presentes), y la *equitatividad* de especies (relación entre las abundancias relativas de cada especie) (Magurran 2004). Existen diferentes maneras de calcular estos parámetros, que también han sido adaptadas para su uso en estudios de ecología microbiana. Por ejemplo, el índice de Simpson (D) (Simpson 1949) es una de las medidas más significativas y robustas de diversidad disponibles. A medida que D aumenta, la diversidad disminuye, y por lo general este índice se expresa como  $1-D$  o  $1/D$  (Magurran 2004).

La similitud entre comunidades tiene en cuenta el grado en que se parecen en su estructura, por ejemplo en base a que comparten ciertos atributos (especies, OTUs). A fin de evaluar el grado de similitud entre las comunidades bacterianas de las cuatro condiciones, se calculó el índice de Bray-Curtis (Bray and Curtis 1957). El índice de Bray-Curtis es ampliamente utilizado, ya que tiene en cuenta la abundancia relativa de los atributos compartidos y no sólo su presencia o ausencia. Esto es porque la contribución al índice de las especies o los OTUs abundantes es mayor que la de los raros. Esto significa que si dos comunidades comparten OTUs

que son abundantes se parecerán más entre sí que si comparten OTUs que no son abundantes, o son abundantes en sólo una de ellas. Además, el índice de Bray-Curtis cumple con varios criterios prácticos deseables en un índice, como por ejemplo, que el valor del índice sea uno (1) cuando dos muestras son idénticas, y cero (0) cuando las muestras no tienen ningún atributo en común (Magurran 2004).

Se analizaron un total de 44.380 secuencias de la región variable V4 del gen ARNr 16S, correspondientes a los tres sistemas experimentales (expOR08, expOR08-O, y expOR08-ON), y a la muestra de sedimento original OR08, la cual también se incluye en este capítulo como referencia. Se obtuvo una cobertura de al menos el 94% en todos los casos (Tabla 4.2.2). El análisis mediante agrupamiento en OTUs al 97% mostró una alta riqueza bacteriana ( $S_{obs}$  y *Chao1*), junto con valores altos de diversidad (1/D), tanto para OR08 como para los sistemas experimentales expOR08 y expOR08-O (Tabla 4.2.2). OR08 presentó la mayor riqueza bacteriana, con aproximadamente 1800 y 3000 OTUs observados y estimados, respectivamente (Tabla 4.2.2). El sistema experimental expOR08 mostró una disminución en los OTUs observados ( $S_{obs}$ ) del 38% respecto al sedimento original OR08, lo que puede atribuirse al efecto del pasaje a las condiciones de laboratorio (Tabla 4.2.2). Sin embargo, el sistema experimental expOR08 fue el más similar al sedimento original, siendo el índice de Bray-Curtis calculado de 0,48 (Figura 4.2.3 A). Esta similitud también se observa al analizar las abundancias relativas de los filos observados (Figura 4.2.3 C), calculadas en base a la clasificación de las secuencias de acuerdo a la taxonomía de la base de datos SILVA (Materiales y Métodos, Sección 3.10.2.3).

En el sistema experimental expOR08-O se observó una cantidad de OTUs menor con respecto a expOR08 y OR08 (Tabla 4.2.2), y los valores del índice de Bray-Curtis fueron de 0,47 con expOR08, y de 0,34 con OR08 (Figura 4.2.3 A). Al analizar las abundancias relativas de los filos observados, se observa principalmente un aumento de las Proteobacterias (58,7% del total de secuencias), y una disminución de las Acidobacterias (14,7% del total de secuencias), respecto al sedimento original OR08 y al sistema expOR08 (Figura 4.2.3 C).

La mayor simplificación de la comunidad bacteriana se observó en el sistema expOR08-ON, con solamente 163 y 288 OTUs observados y estimados, respectivamente, y un valor de 1/D un orden de magnitud menor (Tabla 4.2.2). Esta también fue la única muestra donde se observó que la curva de rarefacción de OTUs observados a distintos esfuerzos de muestreo mostraba un comportamiento asintótico (Figura 4.2.3 B). La estructura de la comunidad bacteriana luego de la exposición a petróleo crudo y nutrientes fue muy diferente a la del sedimento original y a la de las otras dos condiciones experimentales, siendo los valores del índice de Bray-Curtis calculados



entre 0,03 y 0,07 (Figura 4.2.3 A). Esta gran simplificación de la comunidad bacteriana también es evidente al analizar las abundancias relativas de los filos observados, donde solamente dos filos (Proteobacteria y Bacteroidetes) comprenden el 99% del total de secuencias (Figura 4.2.3 C). Estos resultados indican un importante enriquecimiento de determinados microorganismos en estas condiciones.

**Tabla 4.2.2. Diversidad bacteriana en la muestra de sedimento OR08 y en los sistemas experimentales derivados, estimada mediante la pirosecuenciación de amplicones del gen ARNr 16S.**

| Muestra    | N <sup>(a)</sup> | S <sub>obs</sub> <sup>(b)</sup> | C <sup>(c)</sup> | Chao1            | 1/D <sup>(d)</sup>  |
|------------|------------------|---------------------------------|------------------|------------------|---------------------|
| OR08       | 15.344           | 1829                            | 94%              | 3011 (2817-3243) | 23,17 (22,08-24,39) |
| expOR08    | 9357             | 1128                            | 94%              | 1961 (1788-2179) | 29,44 (27,77-31,33) |
| expOR08-O  | 11.636           | 896                             | 96%              | 1503 (1366-1680) | 30,10 (28,98-31,31) |
| expOR08-ON | 8043             | 163                             | 99%              | 288 (230-398)    | 4,05 (3,91-4,20)    |

<sup>(a)</sup>Número de secuencias obtenidas luego de descartar secuencias de baja calidad, quimeras, y secuencias no asignadas al dominio Bacteria.

<sup>(b)</sup>Número de OTUs observados, definidos a una distancia de corte de 0,03.

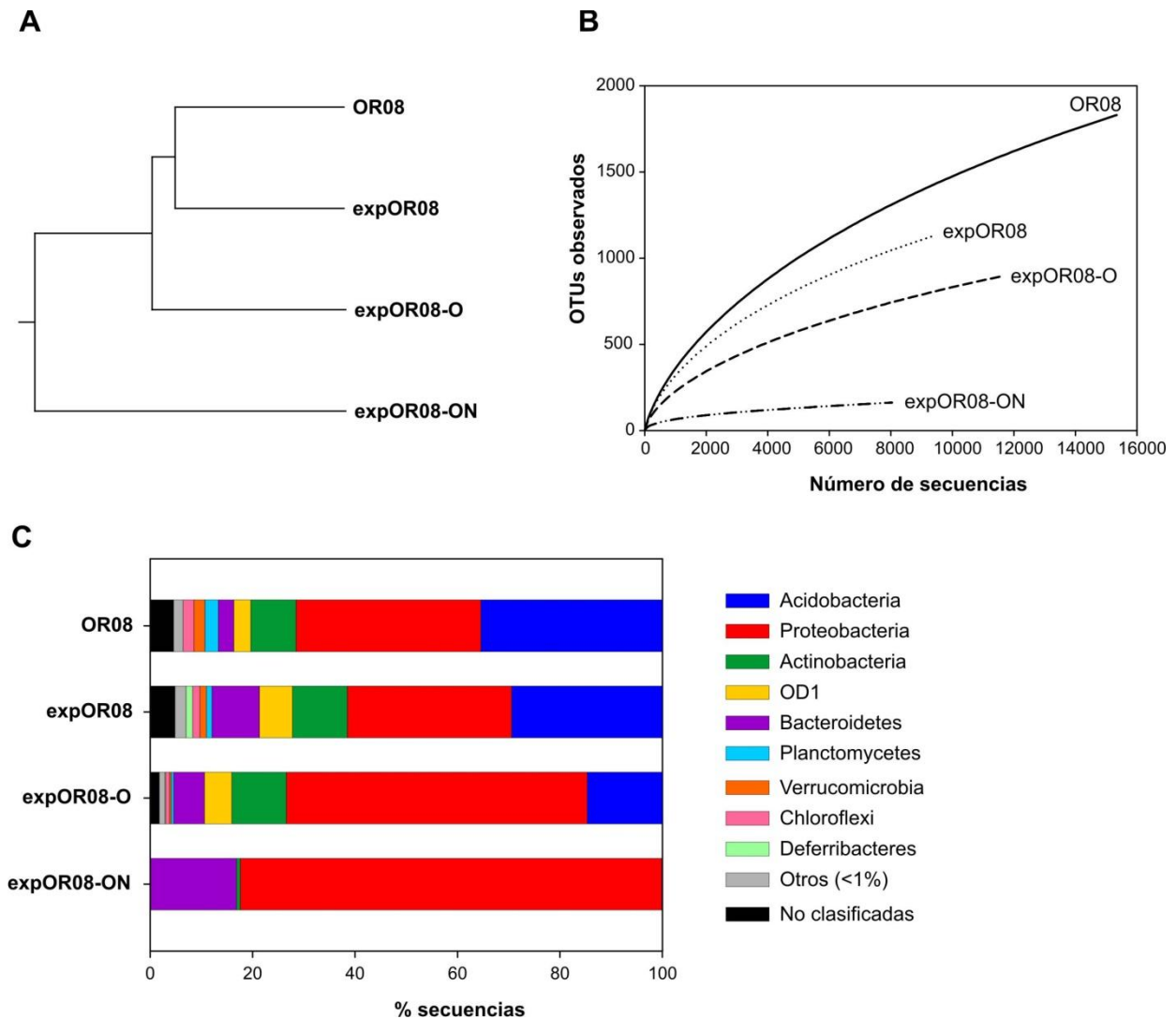
<sup>(c)</sup>Estimador de cobertura de Good (Good 1953).

<sup>(d)</sup>Inversa del índice de diversidad de Simpson (Simpson 1949). Para los índices *Chao1* y *1/D*, los intervalos de confianza del 95% se indican entre paréntesis.

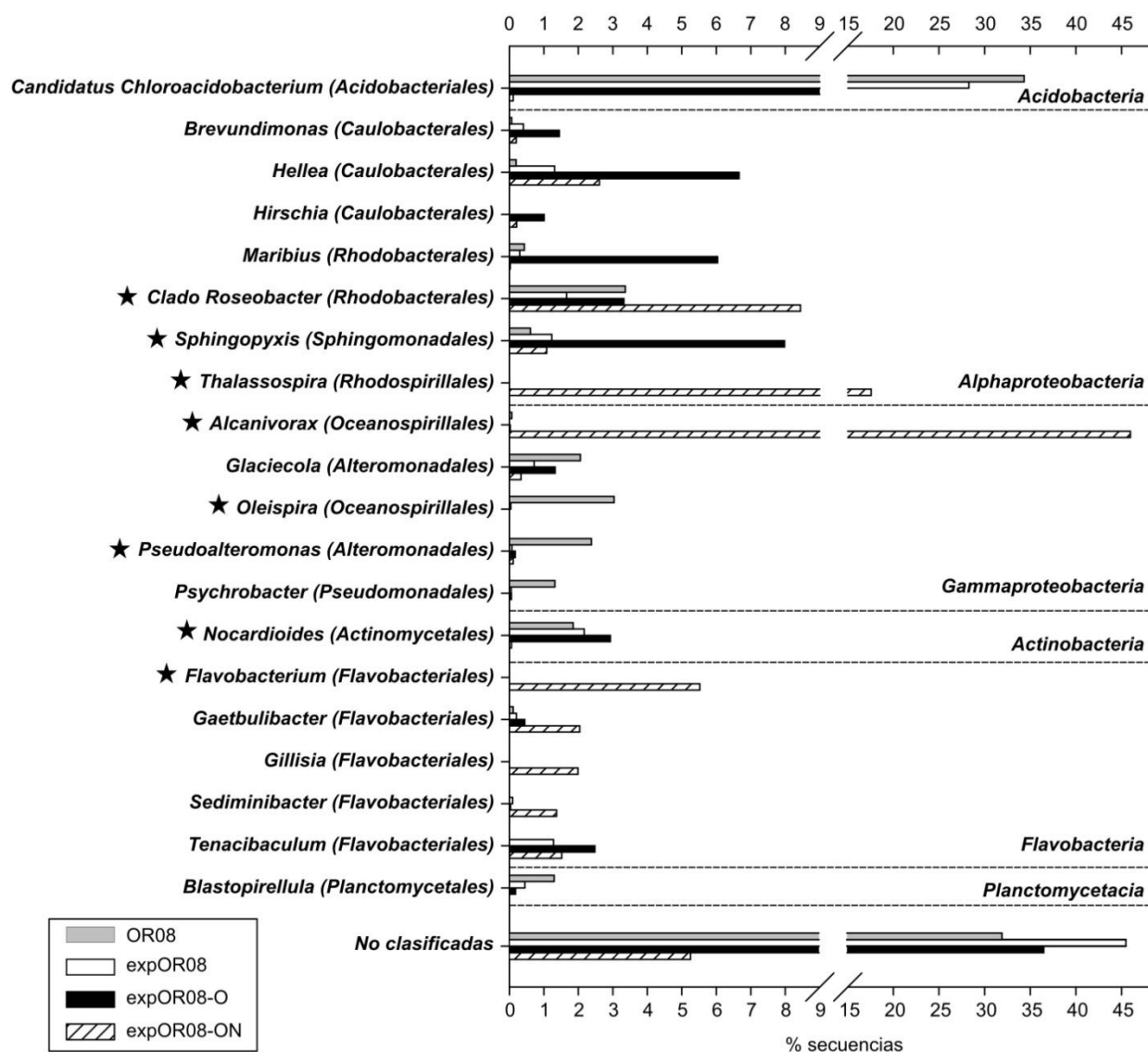
En el capítulo anterior se observó que en OR08 eran abundantes varios géneros bacterianos cuyas cepas han sido típicamente relacionadas con la biodegradación de hidrocarburos (*Oleispira*, *Pseudoalteromonas*, *Nocardioides*, y bacterias del clado *Roseobacter*), como así también microorganismos psicrófilos como *Glaciecola* y *Psychrobacter* los cuales se han visto asociados a la biodegradación en estudios independientes del cultivo. De estos grupos, *Nocardioides*, *Glaciecola* y el clado *Roseobacter* también fueron abundantes luego del agregado de petróleo crudo (expOR08-O) (Figura 4.2.4). La clase Alphaproteobacteria fue la clase mayoritaria en el sistema expOR08-O (34,6% del total de secuencias), observándose varios grupos enriquecidos con respecto a OR08: los géneros *Brevundimonas*, *Hellea*, y *Hirschia* del orden Caulobacterales; el género *Maribuis* del orden Rhodobacterales; y el género *Sphingopyxis* del orden Spingomonadales (Figura 4.2.4).

En el sistema expOR08-ON, se observó un gran enriquecimiento del género *Alcanivorax* (Gammaproteobacteria), llegando casi a la mitad del total de secuencias (46%), seguido de *Thalassospira* (17,6% del total de secuencias) y el clado *Roseobacter* (8,4%) (Figura 4.2.4).

Varios grupos de la clase Flavobacteria también fueron enriquecidos: *Flavobacterium*, *Gaetbulibacter*, *Gillisia*, *Sediminibacter*, y *Tenacibaculum* (Figura 4.2.4).



**Figura 4.2.3. A. Agrupamiento de las muestras de acuerdo al nivel de disimilitud entre ellas.** Dendrograma construido a partir de la matriz de disimilitud (1-índice de Bray Curtis) utilizando el algoritmo UPGMA en el software mothur (Schloss, Westcott et al. 2009). El índice de Bray-Curtis fue calculado teniendo en cuenta los OTUs compartidos (definidos al 97% de identidad). **B. Curvas de rarefacción de OTUs observados (definidos al 97% de identidad) versus el esfuerzo de muestreo (número de secuencias).** Puede observarse que la curva correspondiente al sistema expOR08-ON es la única que muestra un comportamiento asintótico, mientras que para las demás muestras (OR08, expOR08 y expOR08-O), probablemente se observarían nuevos OTUs con la obtención de más secuencias. **C. Frecuencias relativas de los filos de la comunidad bacteriana de OR08 y de los sistemas experimentales expOR08, expOR08-O, y expOR08-ON, observados mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S.** La longitud de las barras mostradas corresponde al porcentaje de lecturas clasificadas en cada categoría. Se indican solamente las categorías con abundancias relativas > 1% en al menos una de las muestras. La categoría “Otros” corresponde a la suma de los valores observados de las categorías con abundancias relativas < 1% en todas las muestras.



**Figura 4.2.4.** Frecuencias relativas de géneros seleccionados de la comunidad bacteriana de OR08 y de los sistemas experimentales expOR08, expOR08-O, y expOR08-ON, observados mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S. Los géneros para los cuales se conocen bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran marcados con una estrella. La longitud de las barras mostradas corresponde al porcentaje de lecturas clasificadas en cada categoría. Se indican solamente las categorías que pudieron ser clasificadas hasta el nivel de género, con abundancias relativas  $\geq 1\%$  en al menos una de las muestras. La suma de las secuencias no clasificadas al nivel de género se muestra en la categoría “No clasificadas”.

#### 4.2.2.1.3 Cambios observados en la diversidad de secuencias de genes *alkB*

Las secuencias parciales *AlkB* obtenidas a partir de las bibliotecas correspondientes a los sistemas experimentales fueron agrupadas en Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs) definidos a un punto de corte de 80% de identidad al nivel de aminoácidos entre sus integrantes (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009). Se observaron cinco OTUs en la

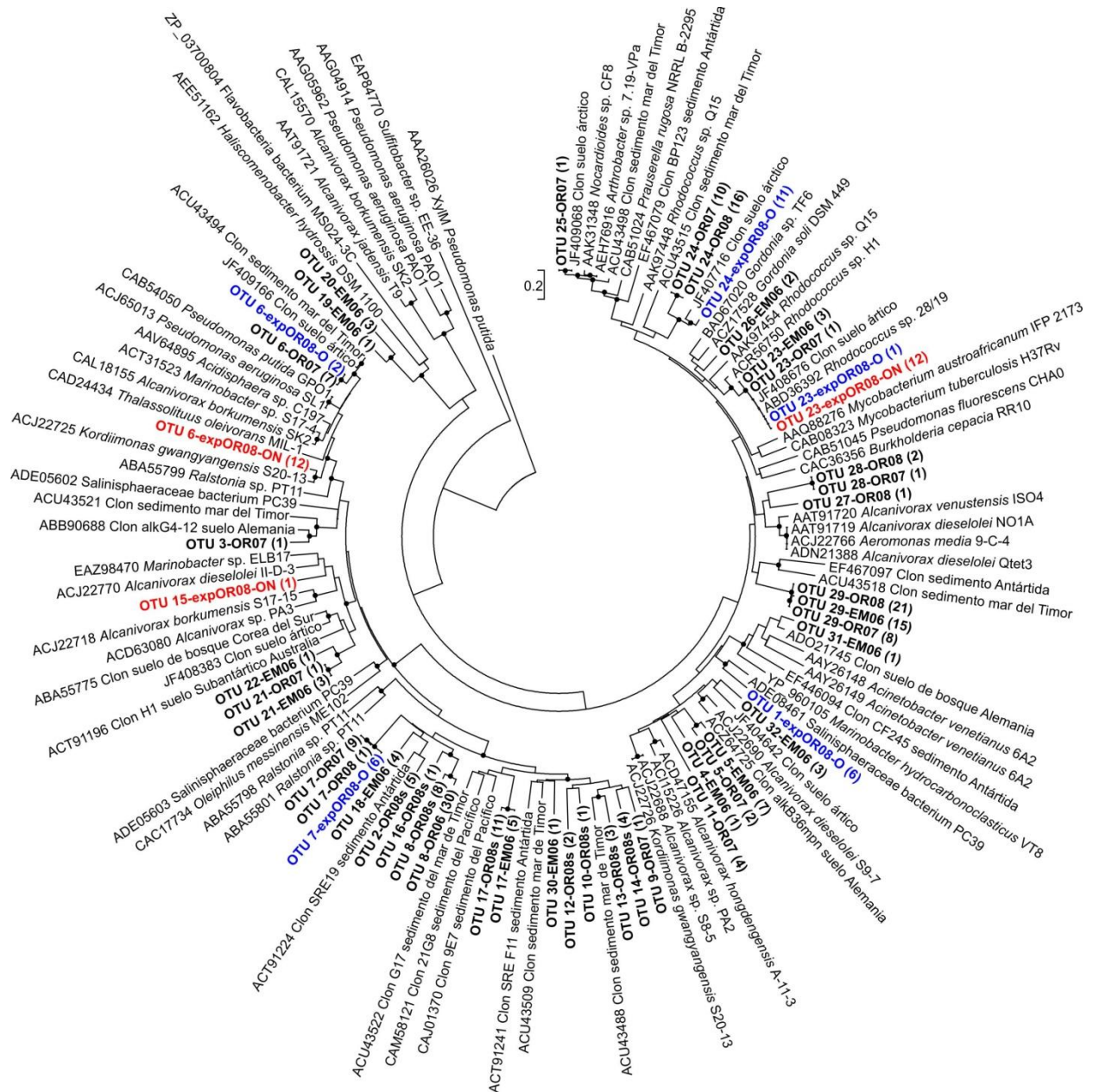
biblioteca correspondiente al sistema expOR08-O (Tabla 4.2.3). Cuatro de estos OTUs también habían sido observados en las muestras de sedimentos de Bahía Ushuaia (OTUs #6, 7, 23, 24; Figura 4.2.5). El OTU más abundante (#24, 42% del total de secuencias) se encontró relacionado con una secuencia de un clon proveniente de una muestra de suelo Ártico (Bell, Yergeau et al. 2011), sin un representante cultivado conocido cercano (Figura 4.2.5). Los OTUs #1 y 7 siguieron en abundancia (23% del total de secuencias cada uno). El OTU #1 agrupó con una secuencia AlkB proveniente de una bacteria marina de la familia Salinisphaeraceae (Clase Gammaproteobacteria, nro. de acceso Genbank ADE08461). Por otro lado, el OTU #7 se encontró más relacionado con un grupo de secuencias provenientes exclusivamente de otros estudios independientes del cultivo basados en sedimentos marinos, junto con varios OTUs de los sedimentos de Bahía Ushuaia (Figura 4.2.5). Los dos OTUs minoritarios fueron el OTU #6, claramente relacionado con clones no cultivados del Ártico y de sedimentos marinos profundos, y el OTU #23 que presentó un 100% de identidad con la secuencia AlkB de *Rhodococcus* sp. 28/19 (ABD36392) (Figura 4.2.5).

En la biblioteca correspondiente al sistema expOR08-ON, se observaron tres OTUs, dos de los cuales comprendieron el 96% del total de secuencias (#6 y 23). Como se describió anteriormente, los OTUs #6 y 23 también fueron observados en la biblioteca del sistema experimental expOR08-O, si bien fueron minoritarios. Sin embargo, en este caso la secuencia obtenida de esta muestra se encontraba en otro subgrupo dentro del OTU #6, relacionado con la secuencia AlkB de *Kordiimonas gwangyangensis* S20-13 (ACJ22725) (Figura 4.2.5). El OTU #23 presentó un 100% de identidad con la secuencia AlkB de *Rhodococcus* sp. 28/19 (ABD36392) (Figura 4.2.5).

Para el sistema expOR08 (correspondiente a la condición sin agregado de petróleo o nutrientes), se obtuvieron amplificaciones por PCR de bajo rendimiento, junto con el clonado de una alta proporción de fragmentos de ADN inespecíficos.

**Tabla 4.2.3. Estimadores de diversidad de las bibliotecas *alkB* construidas a partir de los sistemas experimentales, y comparación con la biblioteca *alkB* de OR08.**

| Biblioteca | N  | S <sub>obs</sub> | Cobertura | Chao1    |
|------------|----|------------------|-----------|----------|
| OR08       | 41 | 5                | 95%       | 6 (5-13) |
| expOR08-O  | 26 | 5                | 96%       | 5        |
| expOR08-ON | 25 | 3                | 96%       | 3        |



**Figura 4.2.5.** Árbol filogenético construido utilizando las secuencias AlkB traducidas de las bibliotecas de clones de este trabajo y secuencias representativas de las bases de datos. Los números de acceso correspondientes a la base de datos Genbank se indican al comienzo de cada secuencia. Para construir el árbol, se utilizó una secuencia representativa por OTU y por cada biblioteca. Los OTUs se muestran en negrita como: **número de OTU-biblioteca (número de secuencias)**. Los clones correspondientes a los sistemas experimentales con agregado de petróleo crudo (expOR08-O), y de petróleo más nutrientes (expOR08-ON) se encuentran marcados en azul y rojo, respectivamente. Se utilizó el algoritmo *neighbor-joining* y el modelo Dayhoff en el software MEGA 5 (Tamura, Peterson et al. 2011). Los círculos negros en los nodos indican valores de bootstrap  $\geq 60\%$  (1000 repeticiones). Como grupo externo se utilizó la secuencia correspondiente a la enzima Xileno monooxigenasa (XylM) de *Pseudomonas putida* (AAA26026). La longitud de la barra mostrada corresponde a 20 % de distancia en aminoácidos.

### 4.2.3 DISCUSIÓN

En este capítulo, mediante la construcción de sistemas experimentales de exposición a petróleo crudo con y sin el agregado de nutrientes, observamos una rápida degradación de los *n*-alcanos (20 días), acompañada de cambios en la comunidad bacteriana, resultando en el enriquecimiento de grupos bacterianos diferentes en cada condición experimental. Otros estudios también han reportado que las comunidades bacterianas de sitios con una historia de exposición a hidrocarburos son capaces de responder rápidamente y eficientemente a una nueva exposición a los contaminantes, por ejemplo en comparación con comunidades bacterianas de sitios prístinos (Greenwood, Wibrow et al. 2009; Kauppi, Romantschuk et al. 2012 2010). Teniendo en cuenta la simplificación de los sistemas experimentales utilizados, el efecto del laboratorio propiamente dicho no fue drástico, observándose que en la condición sin el agregado de petróleo crudo o nutrientes (expOR08) se mantuvo una alta proporción de la diversidad original durante el experimento, y también se observó una relativa similitud entre las comunidades de OR08 y expOR08 (Figuras 4.2.3 y 4.2.4). Este tipo de sistemas experimentales presentan las ventajas de la simplicidad a la hora de controlar las condiciones experimentales. Sin embargo, es importante tener presente que obviamente en su simplificación se excluyen variables ambientales que influyen en los procesos de biodegradación en sedimentos intermareales, como por ejemplo, la influencia de las mareas, y los mecanismos de bioturbación, y al respecto se han desarrollado otras estrategias que tratan de imitar las condiciones ambientales (Cravo-Laureau and Duran 2014). Por otro lado, estos experimentos no pudieron analizarse estadísticamente debido a la falta de réplicas, por lo cual los resultados aquí descriptos deben considerarse simplemente como punto de partida para construir hipótesis a evaluar en nuevos estudios.

Analizamos los cambios en las comunidades bacterianas luego de 20 días de exposición, en las tres condiciones experimentales (expOR08, expOR08-O, expOR08-ON). Analizamos estos cambios por medio de un gen marcador filogenético (el gen para el ARNr 16S) y un gen funcional (*alkB*). En el caso de los sistemas expOR08-O y expOR08-ON, se observó una buena amplificación y selección de secuencias de genes *alkB* específicas. Por el contrario, se obtuvo una amplificación pobre junto con el clonado de productos inespecíficos para el sistema sin el agregado de petróleo crudo o nutrientes (expOR08). Esto sugiere la falta de selección de poblaciones bacterianas portadoras de genes *alkB*, luego de la dilución de los alcanos presentes en el sedimento original OR08 por el agregado de agua de mar no contaminada al sistema experimental.

En concordancia con la detección de secuencias *alkB* relacionadas con miembros del filo Proteobacteria en el sistema expOR08-O (OTUs #1, 7, y 6), los miembros de las clases

Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria fueron muy abundantes mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S (34,6% y 7% del total de secuencias, respectivamente). En otros estudios, los miembros de estas clases también fueron predominantes en las comunidades bacterianas de sedimentos marinos luego de una exposición a hidrocarburos, y se ha sugerido que tienen un rol importante en la degradación de hidrocarburos en el ambiente marino (Head, Jones et al. ; Yakimov, Timmis et al. 2007; Kostka, Prakash et al. 2011). Entre estas poblaciones, fue notable el enriquecimiento de los géneros *Sphingopyxis* (8%), *Hellea* (6,7%) y *Maribius* (6%) con respecto al sedimento original y al sistema experimental expOR08 (Alphaproteobacteria, Figura 4.2.4). *Sphingopyxis* y otros miembros de la familia Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*) poseen la capacidad de degradar una amplia variedad de hidrocarburos aromáticos mono- y policíclicos, y se ha sugerido su importancia en la degradación de compuestos aromáticos en varios ambientes, incluyendo el ambiente marino (Kertesz and Kawasaki 2010). Las bacterias de esta familia podrían ser más competitivas en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, ya que se han identificado cepas del género *Spingomonas* (cercanamente relacionado a *Sphingopyxis*) capaces de degradar hidrocarburos aromáticos a bajas concentraciones de nutrientes (Baraniecki, Aislabie et al. 2002; Leys, Bastiaens et al. 2005). Por otro lado, se conoce muy poco de los géneros *Maribius* (familia Rhodobacteraceae) (Choi, Cho et al. 2007) o *Hellea* (familia Hyphomonadaceae) (Alain, Tindall et al. 2008). Harwati y colaboradores caracterizaron diversos aislamientos marinos según su capacidad de degradar hidrocarburos, y entre ellos un aislamiento identificado como *Maribius bermudensis* fue capaz de degradar *n*-alcanos de longitud C10-C35 (Harwati, Kasai et al. 2007). No encontramos al momento de la redacción de esta Tesis estudios sobre las capacidades degradativas de hidrocarburos de miembros del género *Hellea*.

Las secuencias del gen ARNr 16S clasificadas como *Nocardioides* (y otras Actinobacterias) también fueron abundantes en el sistema expOR08-O (Figuras 4.2.3 y 4.2.4). En el capítulo anterior sugerimos que las poblaciones bacterianas del género *Nocardioides*, u otras Actinobacterias que no pudieron ser clasificadas hasta el nivel de género (Figura 4.1.7 C) podrían estar hospedando la variante *alkB* correspondiente al OTU #24. En concordancia, este OTU también fue fuertemente seleccionado en la condición expOR08-O (Figura 4.2.5). Es interesante el hecho de que varias de las poblaciones microbianas que se encontraron en este sistema experimental ya estaban presentes en relativa alta abundancia en los sedimentos de OR08. Esto se observó tanto en los análisis basados en genes biomarcadores filogenéticos como en los funcionales. Esto estaría indicando que los genes seleccionados con la exposición a hidrocarburos serían apropiados para ser utilizadas como biomarcadores ya que estarían

detectando poblaciones que participan normalmente en la atenuación natural de estos compuestos en el medio ambiente. Se necesitarían estudios en esta dirección para confirmar esta hipótesis, involucrando estos biomarcadores en ensayos cuantitativos (por ejemplo qPCR, (Marcos, Lozada et al.)).

En el sistema expOR08-ON, se observó una alta abundancia de secuencias *alkB* relacionadas con genes de miembros del filo Proteobacteria (OTUs #6 y 15). En concordancia, los géneros *Alcanivorax* (Gammaproteobacteria) y *Thalassospira* (Alphaproteobacteria) fueron dominantes mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S, y en conjunto representaron el 63,5% del total de secuencias (Figura 4.2.5). Las bacterias del género *Alcanivorax* son cosmopolitas en el ambiente marino, y degradan eficientemente (y casi exclusivamente) alcanos lineales y ramificados. Pertenecen al grupo de bacterias hidrocarbonoclásticas obligadas, importantes globalmente en la remoción de hidrocarburos en ambientes marinos contaminados (Yakimov, Timmis et al. 2007). Nuestros resultados concuerdan con otros estudios donde se observó que *Alcanivorax* es un colonizador temprano y dominante en experimentos de exposición a hidrocarburos con el agregado de nutrientes (bioestimulación) (S. and M. 2010). *Alcanivorax* presenta varias capacidades que le otorgan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos degradadores, como la capacidad de transportar nutrientes y oligoelementos eficientemente (que suelen ser escasos en el ambiente marino), la producción de biosurfactantes, y la presencia de varios sistemas enzimáticos para la degradación de alcanos (S. and M. 2010). Por otro lado, las bacterias del género *Thalassospira* también se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente marino (Lai, Liu et al. 2014), originalmente reconocidas por su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Kodama, Stiknowati et al. 2008; Zhao, Wang et al. 2010), aunque recientemente han sido relacionadas también con la biodegradación de alcanos (Jiménez, Viñas et al. 2011). Sin embargo, no encontramos información de genes de la familia *alkB* reportados para *Thalassospira*, tanto en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como en los cuatro genomas secuenciados de *Thalassospira* (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>). Esto, sumado a que en el sistema experimental se encontraba en alta proporción junto con *Alcanivorax*, sugiere que probablemente estos dos géneros bacterianos estén participando cooperativamente de la biodegradación del petróleo crudo, siendo *Thalassospira* la responsable de la biodegradación de la fracción de aromáticos. Este tipo de interacciones entre microorganismos se han observado en varias oportunidades en experimentos de biodegradación de hidrocarburos (McGenity, Folwell et al. 2012).



La otra variante *alkB* abundante en el sistema expOR08-ON fue idéntica al nivel de su secuencia de aminoácidos con una secuencia AlkB de *Rhodococcus* (OTU #23, Figura 4.2.3). Este resultado no coincidió con lo observado mediante el análisis de amplicones del gen ARNr 16S, donde sólo un 0,25% de las secuencias fueron clasificadas como *Rhodococcus* para este sistema. De hecho, los miembros del filo Actinobacteria en general fueron poco abundantes luego de la exposición a petróleo crudo y nutrientes (0,73%, Figura 4.2.4 C). Esta falta de concordancia podría deberse a un desvío introducido por el par de cebadores utilizados en la construcción de las bibliotecas *alkB*, los cuales fueron diseñados utilizando una mayoría de secuencias de *Rhodococcus*, de acuerdo a lo que se encontraba disponible en las bases de datos al momento del diseño de los primers (Olivera, Nievas et al. 2009). Alternativamente, es posible que otras bacterias distintas a *Rhodococcus* estén hospedando este gen (OTU #23), habiéndolo adquirido por transferencia horizontal. Interesantemente, esta misma discrepancia entre las abundancias de los genes de *Rhodococcus* fue observada recientemente en un estudio metagenómico de biorremediación de suelos del Ártico contaminados con diesel (Yergeau, Sanschagrín et al. 2012).

Por otro lado, fue notable el incremento de la proporción de secuencias de genes ARNr 16S clasificadas como pertenecientes al filo Bacteroidetes luego de la exposición a petróleo crudo y nutrientes, en particular de la familia Flavobacteriaceae (orden Flavobacteriales, Figuras 4.2.4 C y 4.2.5). En general, los clones o aislamientos del filo Bacteroidetes reportados en ambientes marinos contaminados con hidrocarburos pertenecen a esta familia (Kim and Kwon 2010). Las Flavobacterias han sido relacionadas más frecuentemente con la degradación de PAHs de alto peso molecular (Juhasz and Naidu 2000). Recientemente, en un estudio de comunidades costeras del Golfo de México, se observó que miembros de este grupo incrementaron su abundancia en mesocosmos construido a partir de arena de playas suplementados con PAHs (Kappell, Wei et al. 2014).

En conclusión, la complementación de la información basada en los genes marcadores funcionales (bibliotecas *alkB*) con un enfoque filogenético (secuenciación en gran escala de fragmentos del gen ARNr 16S) nos permitió construir una imagen más completa de las comunidades bacterianas que habitan los sedimentos subantárticos, así como también su respuesta frente a una exposición a petróleo crudo con y sin el agregado de nutrientes. Por un lado, se logró la identificación de genes *alkB* pertenecientes a poblaciones bacterianas claves en este sitio, los cuales pueden ser utilizados como biomarcadores funcionales en futuros estudios moleculares básicos y aplicados. Por otro lado, la secuenciación en gran escala fue fundamental para la detección de géneros para los cuales no hay información de los genes *alkB*, y/o que no

habían sido asociados previamente a la degradación de hidrocarburos. Por ejemplo, en los sistemas experimentales, las Alphaproteobacteria de los géneros *Brevundimonas*, *Hellea*, *Hirschia*, *Maribius*, y *Thalassospira*, y las Flavobacteria de los géneros *Flavobacterium*, *Gaetbulibacter*, *Gillisia*, y *Sediminibacter*, se detectaron en relativamente altas abundancias con respecto al sedimento original y al sistema expOR08. Estos géneros constituyen candidatos para futuros trabajos que involucren estudios genómicos y/o de las capacidades degradativas.

### 4.3 CAPÍTULO 3: ANÁLISIS METAGENÓMICO DE ALCANO MONOOXIGENASAS ALKB: IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE FRAGMENTOS GENÓMICOS CONTENIENDO SECUENCIAS DE GENES *ALKB* EN SEDIMENTOS COSTEROS DE BAHÍA USHUAIA

#### 4.3.1 INTRODUCCIÓN

La metagenómica se basa en el estudio del conjunto de la información genómica de (teóricamente) todos los microorganismos de una muestra ambiental (el metagenoma) (Handelsman, Rondon et al. 1998; Riesenfeld, Schloss et al. 2004). Una de estas estrategias es la secuenciación al azar del metagenoma, donde la muestra de ADN metagenómico se fragmenta, y estos fragmentos son secuenciados (mediante el uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento), obteniéndose una muestra aleatoria de datos de los miembros totales de la comunidad en estudio. La gran ventaja de esta técnica es que ha permitido independizarse de los desvíos relacionados con la amplificación por PCR o el clonado, y ha proporcionado información sobre genes y microorganismos previamente inaccesibles por otras técnicas (Eisen 2007). Las secuencias parciales resultantes (lecturas) se intentan unir buscando reconstruir la secuencia original, en un proceso denominado ensamblado (*assembly*). Sin embargo, debido a la complejidad de las comunidades microbianas naturales y la corta longitud de las lecturas provenientes de las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, en muchos casos este proceso es altamente ineficiente, y se trabaja con una colección de fragmentos de diferentes longitudes, en su mayoría cortos (Wooley and Ye 2009). En estos casos, el uso de otra estrategia metagenómica complementaria tal como el clonado de insertos grandes del metagenoma en vectores apropiados, puede ayudar en la recuperación de secuencias de genes de longitud completa, con la ventaja adicional de que las enzimas correspondientes se encuentran disponibles para futuros estudios bioquímicos o aplicaciones biotecnológicas (Kim, Kim et al. 2007). Más aún, el análisis del contexto genómico de los genes de interés puede ayudar a dilucidar la posible fisiología y ecología del microorganismo hospedador (Woebken, Teeling et al. 2007; Gomez-Pereira, Schuler et al.).

Una vez obtenidas las secuencias de interés, el siguiente paso es la predicción de genes y elementos genómicos, y la asignación de las posibles funciones (anotación funcional). Para ello, se han desarrollado plataformas bioinformáticas con rutinas de trabajo (*pipelines*) compuestas por *softwares* especializados en secuencias genómicas o metagenómicas. Por ejemplo, el sistema IMG (*Integrated Microbial Genomes*, <http://img.jgi.doe.gov/>) (Markowitz, Chen et al. 2013) desarrollado para la anotación de genomas y metagenomas; y los sistemas RAST (*Rapid Annotation using Subsystems Technology*, <http://rast.nmpdr.org/>) (Overbeek, Olson et al. 2014) y MG-RAST (*Metagenomics analysis server*, <http://metagenomics.anl.gov/>) (Meyer, Paarmann et

al. 2008), desarrollados para la anotación de genomas y metagenomas, respectivamente. Asimismo, estas plataformas bioinformáticas constituyen repositorios de datos y permiten realizar diferentes tipos de análisis, como la visualización de la organización génica, y la comparación con otros genomas o metagenomas. La asignación de las posibles funciones de las proteínas predichas se basa en realizar comparaciones con bases de datos disponibles, las cuales son manualmente curadas, como ser la enciclopedia KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa and Goto 2000), COG (*Clusters of orthologous groups*) (Tatusov, Galperin et al. 2000), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Punta, Coggill et al. 2012), y TIGRFAMs (Selengut, Haft et al. 2007). Por ejemplo, la base de datos COG fue generada comparando las proteínas de todos los genomas microbianos secuenciados con el fin de inferir grupos de genes ortólogos. Cada COG se define como un grupo de genes ortólogos provenientes al menos de tres linajes diferentes. Como los ortólogos normalmente conservan la función a lo largo de la evolución, la identificación de grupos de ortólogos es de gran ayuda para realizar predicciones de las funciones de proteínas nuevas (Tatusov, Galperin et al. 2000). Por otro lado, Pfam es una base de datos de familias de proteínas, donde las familias son grupos de regiones de proteínas que comparten un alto grado de similitud de secuencias (dominios), de donde surge la inferencia de que son homólogas (Punta, Coggill et al. 2012).

Las secuencias que no pueden ser comparadas con la información disponible en las bases de datos permanecen sin identificar y se denominan *ORFans* (secuencias huérfanas). Se estima que sólo entre el 20% y el 50% de las secuencias metagenómicas pueden ser anotadas (Gilbert, Field et al. 2010), con lo cual surge la pregunta de la importancia y de la función del resto de los genes predichos. Las secuencias huérfanas pueden simplemente ser errores producidos durante la predicción de marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, ORFs), pueden ser genes reales que codifican para funciones bioquímicas desconocidas, o podrían tener homología estructural con proteínas conocidas (Godzik 2011). A fin de dilucidar las funciones de las secuencias huérfanas, son necesarios estudios de la estructura de proteínas y caracterizaciones bioquímicas, lo que a su vez ayudará a completar la información de las bases de datos de proteínas (Thomas, Gilbert et al. 2012).

Otro punto importante para el análisis de secuencias provenientes del metagenoma es su asignación taxonómica, esto es la identificación del microorganismo o grupo filogenético al que podría pertenecer. Para ello, se han desarrollado varios algoritmos que emplean dos tipos de información contenida en una secuencia de ADN. Por un lado, los métodos basados en la composición de nucleótidos utilizan las propiedades intrínsecas de las secuencias de ADN, como ser el porcentaje de guanina-citosina (%GC), o la distribución de abundancias de *k-mers*

(subcadenas de longitud  $k$  en una secuencia de ADN) (Thomas, Gilbert et al. 2012). Por otro lado, los métodos basados en la similitud entre secuencias realizan comparaciones con secuencias conocidas disponibles en las bases de datos de referencia. En consecuencia, su poder de resolución dependerá de la información disponible en las mismas (Thomas, Gilbert et al. 2012). Algunos ejemplos de software basados en similitud son: IMG/M (Markowitz, Korzeniewski et al. 2006), MEGAN (Huson, Mitra et al. 2011), CARMA (Krause, Diaz et al. 2008). Asimismo, también se han desarrollado algoritmos “mixtos” que tienen en cuenta tanto la composición como la similitud, como ser PhymmBL y MetaCluster.

En este capítulo se utilizaron dos estrategias metagenómicas a fin de estudiar las variantes de genes alcano monooxigenasas (*alkB*) y su contexto genómico, presentes en sedimentos costeros de Bahía Ushuaia. Este estudio involucró la búsqueda de fragmentos genómicos conteniendo genes *alkB* en el metagenoma clonado (biblioteca metagenómica) y en el metagenoma secuenciado (secuenciación al azar) de muestras de sedimentos del mismo ambiente. Asimismo, se realizó una clasificación filogenética actualizada del gen *alkB*, utilizando secuencias recientemente incorporadas a la base de datos del NCBI. Este árbol se utilizó como referencia para la clasificación de las secuencias AlkB provenientes del metagenoma de los sedimentos de Bahía Ushuaia.

#### 4.3.2 RESULTADOS

##### 4.3.2.1 Construcción de un árbol AlkB de referencia

Se realizó una búsqueda bibliográfica de clasificaciones de Alcano monooxigenasas de la familia AlkB, para usar como referencia para la clasificación filogenética de las secuencias AlkB obtenidas del metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia. La mayoría de los trabajos previos fueron realizados con secuencias pertenecientes a los grupos descritos en los filos Proteobacteria (Heiss-Blanquet, Benoit et al. 2005; Hamamura, Fukui et al. 2008; Wang, Wang et al. 2010; Liu, Wang et al. 2011) y Actinobacteria (Heiss-Blanquet, Benoit et al. 2005; Shen, Young et al. 2010), provenientes de aislamientos (Giebler, Wick et al. 2013) y muestras ambientales (Paisse, Duran et al. 2011; Jurelevicius, Alvarez et al. 2013), incluyendo ambientes marinos (Kuhn, Bellicanta et al. 2009; Wasmund, Burns et al. 2009; Wang, Wang et al. 2010).

Al comparar las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos Bahía Ushuaia con la base de datos de proteínas del NCBI (mediante el algoritmo blastp), observamos que una cantidad importante se encontraba relacionada con secuencias AlkB provenientes de genomas recientemente secuenciados de microorganismos de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria, no

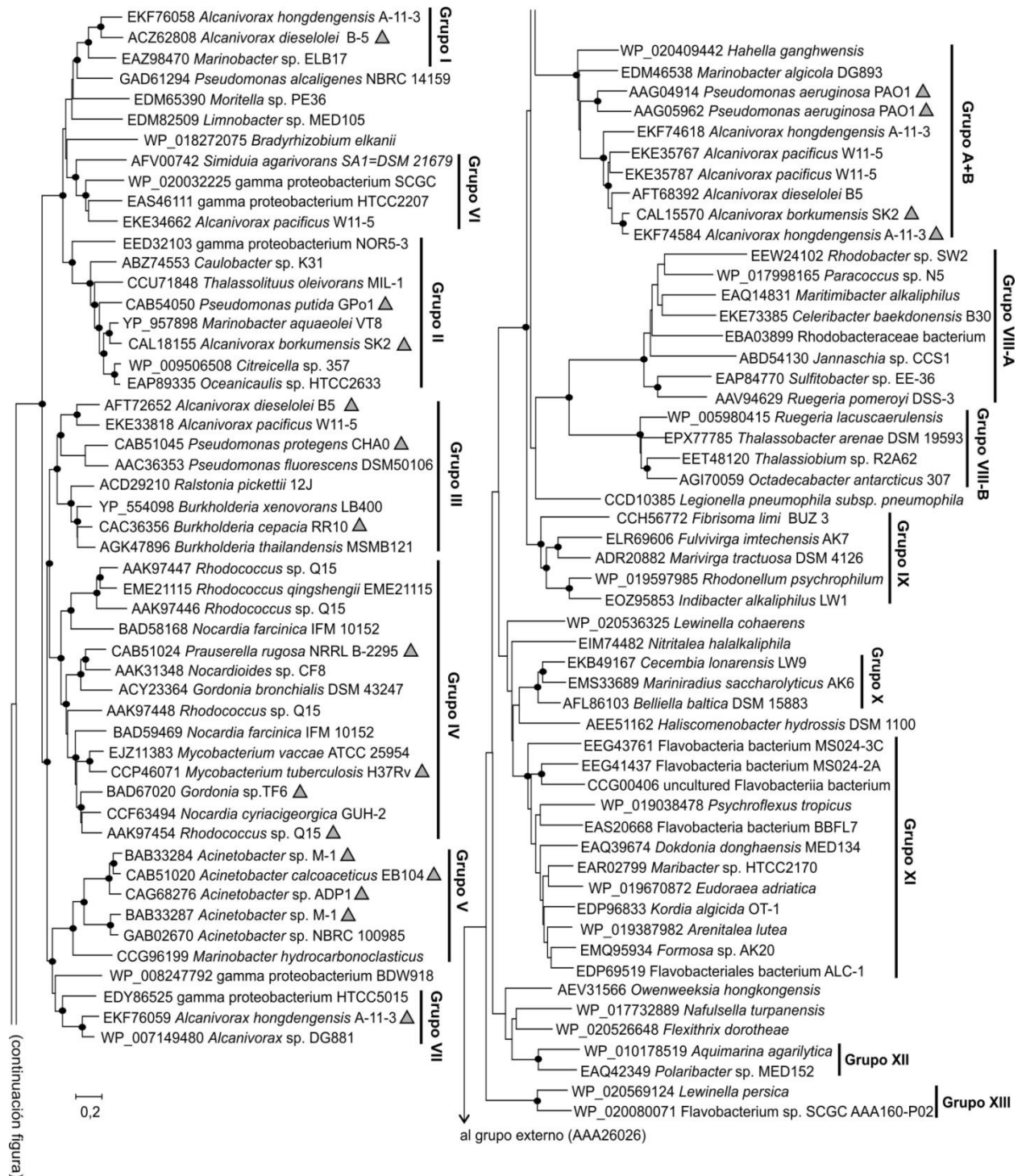
incluidas en los trabajos publicados anteriormente. Debido a este hecho, sumado al crecimiento continuo de las bases de datos de genes, decidimos construir un árbol AlkB de referencia actualizado al momento de nuestros análisis. Para ello, se realizó un análisis filogenético a partir de 105 secuencias AlkB de longitud completa, descriptas en las bacterias pertenecientes a los grupos filogenéticos donde el gen *alkB* se ha reportado en las bases de datos hasta el momento (según nuestro conocimiento). En base a la estructura del árbol obtenido, se definieron 15 grupos de secuencias AlkB con un valor de bootstrap  $\geq 77\%$  (Figura 4.3.1). Los promedios de los valores de identidad entre los miembros de dichos grupos estuvieron entre 52% y 73%, a excepción del Grupo VIII-A, que presentó un valor de identidad promedio del 39% entre sus miembros. Los Grupos I a V y el Grupo A+B fueron asignados siguiendo la clasificación propuesta por Wang et al. (Wang, Wang et al. 2010), con modificaciones menores para incluir secuencias nuevas. Los Grupos VI a XIII fueron definidos en este trabajo.

El **Grupo A+B** incluye secuencias reportadas en bacterias de la clase Gammaproteobacteria, relacionadas a las dos AlkBs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (AAG04914 y AAG05962) (Smits, Balada et al. 2002; Smits, Witholt et al.), y a la Alcano monooxigenasa AlkB2 de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (CAL15570) (Hara, Baik et al. 2004). Las hidroxilasas estudiadas de este grupo degradan alcanos desde C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, y C<sub>12</sub> hasta C<sub>16</sub> (Smits, Balada et al. 2002; Smits, Witholt et al. 2003; van Beilen, Marin et al. 2004; Wang and Shao 2012). El **Grupo I** está formado por las secuencias AlkB de *Alcanivorax dieselolei* B-5 (ACZ62808) (Liu, Wang et al. 2011), *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3 (EKF76058), y *Marinobacter* sp. ELB17 (EAZ98470). Sólo se ha caracterizado bioquímicamente la enzima de *Alcanivorax dieselolei* B-5 (ACZ62808) y se observó que degrada alcanos C<sub>6</sub>–C<sub>16</sub> (Liu, Wang et al. 2011). El **Grupo II** incluye secuencias reportadas en bacterias de las clases Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria, relacionadas a las Alcano monooxigenasas de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (AlkB1, CAL18155) (Hara, Baik et al. 2004) y *Pseudomonas putida* GPo1 (CAB54050) (van Beilen, Smits et al. 2005). Las enzimas estudiadas de este grupo degradan alcanos desde C<sub>5</sub> hasta C<sub>12</sub> o C<sub>13</sub> (van Beilen, Marin et al. 2004; van Beilen, Smits et al. 2005). El **Grupo III** está formado por dos subgrupos: el primero con secuencias reportadas en bacterias de la clase Gammaproteobacteria, relacionadas a la Alcano monooxigenasa de *Pseudomonas protegens* CHA0 (CAB51045) (Smits, Balada et al. 2002); y el segundo con secuencias reportadas en bacterias de la clase Betaproteobacteria, como por ejemplo *Ralstonia* y *Burkholderia* (Marin, Smits et al. 2001). Las enzimas estudiadas del Grupo III degradan alcanos hasta C<sub>16</sub>, en el rango C<sub>6</sub>–C<sub>16</sub> para la enzima de *Alcanivorax dieselolei* B5 (AFT72652), y en el rango de C<sub>12</sub>–C<sub>16</sub> para la enzima de *Pseudomonas protegens* CHA0 (Smits, Balada et al. 2002;

Liu, Wang et al. 2011); como así también alcanos de cadena más larga, en el rango C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub> para la enzima de *Burkholderia cepacia* (Marin, Smits et al. 2001). El **Grupo IV** está formado por las Alcano monooxigenasas típicamente descritas en Actinobacteria, como por ejemplo aquellas caracterizadas en *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Gordonia* (Hamamura, Yeager et al. 2001; Smits, Balada et al. 2002; Whyte, Smits et al. 2002; Fujii, Narikawa et al. 2004). Las enzimas estudiadas de este grupo degradan alcanos desde C<sub>10</sub> ó C<sub>12</sub> hasta C<sub>16</sub>, como es el caso de las enzimas de *Prauserella rugosa* NRRL B-2295, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Smits, Balada et al. 2002), y *Rhodococcus* sp. Q15 (AAK97454) (Whyte, Smits et al. 2002). En cambio, la enzima de *Gordonia* sp.TF6 degrada alcanos C<sub>5</sub>-C<sub>13</sub> (Fujii, Narikawa et al. 2004). El **Grupo V** está formado por las Alcano monooxigenasas denominadas AlkM, inicialmente caracterizadas en *Acinetobacter* (Ratajczak, Geissdorfer et al. 1998; Smits, Röthlisberger et al. 1999; Tani, Ishige et al. 2001; Throne-Holst, Markussen et al. 2006), y su homólogo reportado en *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (CCG96199) (Grimaud, Ghiglione et al. 2012). Las enzimas estudiadas de este grupo utilizan alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> (Throne-Holst, Markussen et al. 2006) (Figura 4.3.1).

Con respecto a los grupos definidos en este trabajo, el **Grupo VI** está compuesto por secuencias AlkBs anotadas en proyectos genómicos recientemente publicados de miembros de la clase Gammaproteobacteria, como por ejemplo *Alcanivorax pacificus* W11-5 (EKE34662) (Lai and Shao 2012) y *Simiduia agarivorans* SA1 (AFV00742) (Lin, Shieh et al. 2013). De hecho, las secuencias pertenecientes a los Grupos I, II y VI están relacionadas filogenéticamente, formando un grupo monofilético con un buen soporte (Figura 4.3.1). El **Grupo VII** está formado por las AlkBs de una gammaproteobacteria identificada como HTCC5015 (EDY86525), *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3 (EKF76059) (Wang and Shao 2012), y *Alcanivorax* sp. DG881 (WP\_007149480). Este grupo se encuentra relacionado filogenéticamente con el Grupo V (Monooxigenasas AlkM). La única enzima estudiada del grupo VII corresponde a la de *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3, y utiliza alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub> (Wang and Shao 2012). Los **Grupos VIII-A y VIII-B** contienen AlkBs provenientes de proyectos de secuenciación genómica de miembros de la familia Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), en su mayoría pertenecientes al clado Roseobacter (Brinkhoff, Giebel et al. 2008), como por ejemplo *Maritimibacter alkaliphilus* (EAQ14831), *Ruegeria pomeroyi* (AAV94629), y *Octadecabacter antarcticus* (AGI70059). Los Grupos IX a XIII están compuestos por AlkBs provenientes de proyectos de secuenciación genómica de miembros del filo Bacteroidetes. En particular, los **Grupos IX y X** contienen AlkBs descritas en miembros del orden Cytophagales. El **Grupo XI** es más extenso y contiene AlkBs descritas en miembros de la clase Flavobacteriia. El **Grupo XII** está formado por las AlkBs de *Aquimarina agarilytica* (WP\_010178519) y *Polaribacter* sp.

MED152 (EAQ42349). El **Grupo XIII** está formado por las secuencias AlkB de *Lewinella persica* (clase Sphingobacteriia, WP\_020569124) y *Flavobacterium* sp. SCGC AAA160-P02 (clase Flavobacteriia, WP\_020080071) (Figura 4.3.1). Según nuestro conocimiento, no se han reportado estudios moleculares o bioquímicos sobre los genes *alkB* de los grupos VIII a XIII.



**Figura 4.3.1. Clasificación de secuencias AlkB de referencia.** Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas de longitud completa, disponibles en la base de datos



del NCBI. El árbol fue construido utilizando el algoritmo *Neighbor Joining* en el software MEGA 5. Los nombres de las secuencias comienzan con el número de acceso de Genbank. Las Alcano hidroxilasas que poseen estudios de evidencia funcional (mediante expresión heteróloga o inactivación génica) se indican con triángulos grises. Los grupos filogenéticos identificados (Grupos I a XIII y A+B) se muestran en negrita. Los nodos donde se observaron valores de bootstrap  $\geq 70$  (1000 replicaciones) se indican con círculos negros. Como grupo externo se utilizó la secuencia correspondiente a la subunidad catalítica de la enzima Xileno monooxigenasa (XylM) de *Pseudomonas putida* (AAA26026). La barra de escala representa 0,2 sustituciones por sitio (20% de distancia) a nivel de aminoácidos.

#### 4.3.2.2 Clasificación de las secuencias AlkB obtenidas del metagenoma de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia

##### 4.3.2.2.1 Búsqueda de secuencias AlkB en el set de datos de secuenciación al azar del metagenoma (identificación *in silico*)

En 2011, el Joint Genome Institute de Estados Unidos (Department of Energy, Joint Genome Institute, USA, <http://jgi.doe.gov/>) financió un proyecto internacional de secuenciación de comunidades microbianas originado y liderado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del CENPAT (*Community Sequencing Program N°321 "Microbial Community Structure and Metabolic Potential of Chronically Polluted Marine Sediments from Cold Regions of the Northern and Southern Hemispheres"*). El objetivo general de este proyecto es analizar la estructura y función de las comunidades microbianas de sedimentos marinos provenientes de cuatro ambientes fríos crónicamente contaminados con hidrocarburos y otros compuestos. En el marco de este proyecto se realizó la secuenciación al azar del metagenoma de seis muestras de sedimentos submareales de Bahía Ushuaia, mediante la plataforma Illumina HiSeq 1500. Las muestras secuenciadas fueron tomadas en dos sitios separados 500 m entre sí: el muelle comercial (MC), y la planta de almacenamiento Orión (OR). Se tomaron tres muestras en cada sitio (Tabla 4.3.1).

**Tabla 4.3.1. Características de las muestras de sedimentos de Bahía Ushuaia utilizadas en la secuenciación al azar del metagenoma.**

| Nombre | Sitio   | Profundidad (m) | pH   | Temperatura (°C) | Salinidad |
|--------|---|-----------------|------|------------------|-----------|
| ARG01  | Muelle Comercial (MC)<br>54° 48,656' S - 68°<br>17,731' O | 11,3            | 8,00 | 8,52             | 29,42     |
| ARG02  |   | 11,3            | 8,01 | 8,66             | 29,34     |
| ARG03  |   | 11,3            | 7,99 | 8,50             | 29,42     |
| ARG04  | Planta Orión (OR)<br>54° 48,256' S - 68°<br>17,296' O     | 12,3            | 7,68 | 8,74             | 29,24     |
| ARG05  |   | 12,3            | 7,79 | 8,60             | 29,30     |
| ARG06  |   | 12,3            | 7,84 | 8,60             | 29,30     |

Mediante el sistema IMG (Markowitz, Chen et al. 2013), se realizó una búsqueda *in silico* de secuencias anotadas como Alcano-1-monooxigenasa (EC 1.14.15.3) en el set de datos resultante. Obtuvimos una gran cantidad de secuencias AlkB (columna 5, Tabla 4.3.2), pero para tener mayor calidad de análisis sólo se conservaron aquellas secuencias de longitud mayor a 80 aminoácidos, y que contuvieran al menos uno de los cuatro motivos de Histidina característicos de la familia AlkB: Histidina 1 (**HEXXHK**), Histidina 2 (**EHXXGHH**), Histidina 3 (**LQRHXDHH**A), y HYG (**NYXEHYG**) (Smits, Röthlisberger et al. 1999; Whyte, Smits et al. 2002). Esta selección dio como resultado un total de 116 secuencias, donde cuatro eran de longitud completa, mientras que el resto tenían una longitud entre 80 y 236 aminoácidos (Tabla 4.3.2).

**Tabla 4.3.2. Características del set de datos de secuenciación al azar del metagenoma utilizado para la búsqueda de secuencias AlkB.**

| Muestra | IMG Genome ID <sup>(1)</sup> | Genes totales <sup>(2)</sup> | Genes codificantes para proteínas <sup>(3)</sup> | Secuencias AlkB <sup>(4)</sup> | Longitudes (aa) <sup>(5)</sup> |
|---------|------------------------------|------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| ARG01   | 3300000125                   | 23.901.811                   | 23.864.833<br>(20,4%)                            | 592 (6)                        | 85-334                         |
| ARG02   | 3300000131                   | 76.956.367                   | 76.833.323<br>(25,8%)                            | 2170 (23)                      | 80-139                         |
| ARG03   | 3300000121                   | 70.057.838                   | 69.942.910<br>(16,55%)                           | 1023 (8)                       | 85-343                         |
| ARG04   | 3300000122                   | 46.868.684                   | 46.791.273<br>(18,72%)                           | 265 (0)                        | -                              |
| ARG05   | 3300000242                   | 97.091.948                   | 96.886.325<br>(27,44%)                           | 1250 (47)                      | 80-350                         |
| ARG06   | 3300000118                   | 49.217.613                   | 49.102.663<br>(30,28%)                           | 878 (32)                       | 80-127                         |

<sup>(1)</sup>Número de identificación de la muestra en la base de datos del IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>).

<sup>(2)</sup>Genes totales = genes codificantes para proteínas + genes ribosomales.

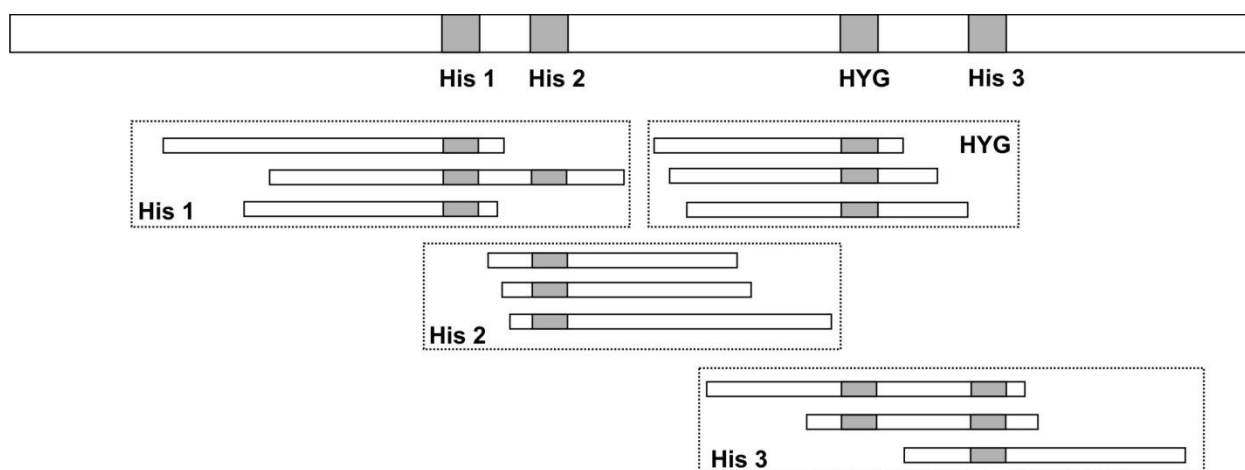
<sup>(3)</sup>El porcentaje de secuencias codificantes para proteínas a las cuales se les pudo asignar una función putativa se indica entre paréntesis.

<sup>(4)</sup>Secuencias encontradas luego de realizar una búsqueda por el número de EC correspondiente a las Alcano-1-monooxigenasas (AlkB). El número de secuencias AlkB luego de los filtros aplicados (longitud  $\geq 80$  aminoácidos y presencia de al menos uno de los motivos de Histidina) se indica entre paréntesis.

<sup>(5)</sup>Se indican las longitudes mínimas y máximas observadas.

#### 4.3.2.2.1.1 Clasificación

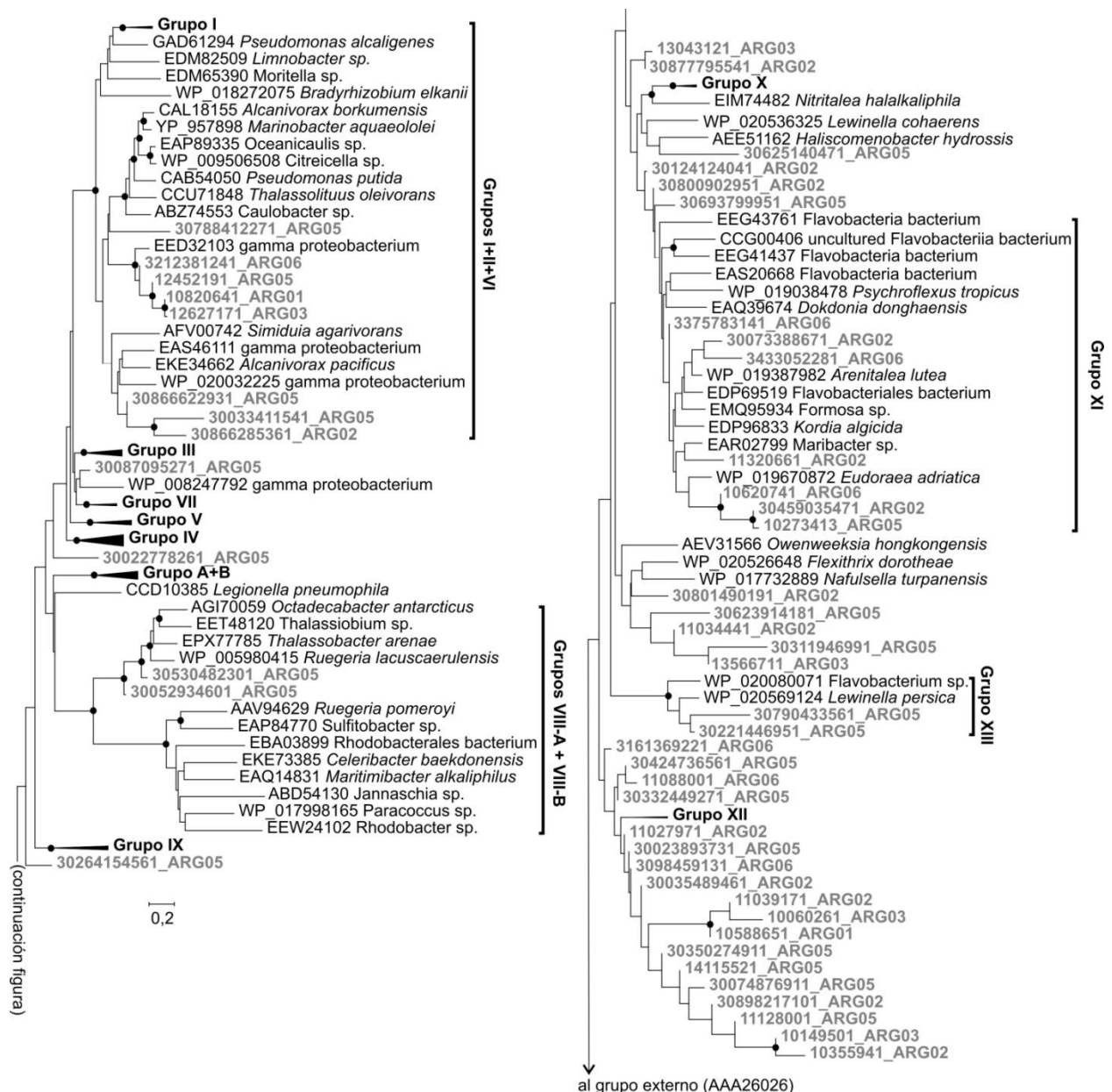
No fue posible realizar un alineamiento único con las secuencias AlkB de referencia (Figura 4.3.1) y todas las secuencias AlkB parciales identificadas *in silico*, ya que estas últimas al no haber sido generadas mediante el uso de cebadores, no siempre se encontraban cubriendo la misma región de la proteína AlkB. Por lo tanto, las secuencias parciales se dividieron en cuatro “grupos de alineamiento” que cubrían diferentes regiones de la proteína AlkB, de acuerdo a la presencia de los motivos de Histidina anteriormente mencionados (Figura 4.3.2). Las secuencias parciales así divididas pudieron ser alineadas correctamente con las secuencias AlkB de referencia. A fin de no perder información y mantener en el mayor grado posible la estructura del árbol original, los alineamientos múltiples no se recortaron en los extremos, y las distancias se calcularon con un tratamiento de supresión de a pares de los espacios y datos ausentes (*pairwise deletion of gaps and missing data*). Los árboles filogenéticos resultantes se muestran en las Figuras 4.3.3 a 4.3.7. Pudimos observar que al trabajar con las secuencias parciales, la estructura general de la mayoría de los grupos filogenéticos se mantuvo, aunque presentaron valores de bootstrap menores en comparación con el árbol de referencia, debido al menor número de posiciones analizadas.



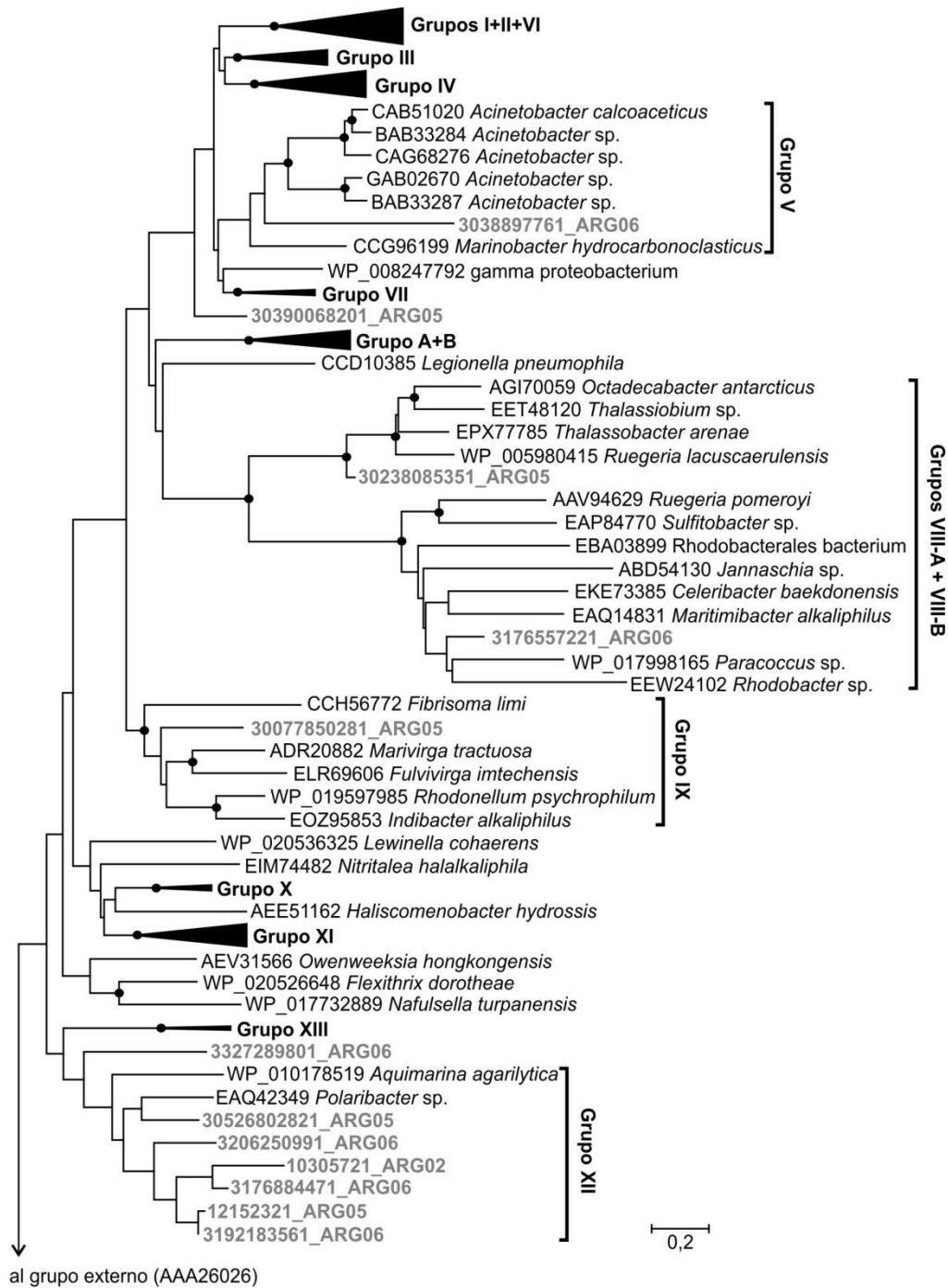
**Figura 4.3.2. Esquema que ilustra cómo se alinearon las secuencias parciales AlkB (abajo) con el alineamiento de secuencias completas de referencia (arriba).** Las secuencias parciales se dividieron en cuatro regiones de alineamiento (recuadros) de acuerdo a la presencia de los motivos de Histidina (en gris, His 1, His 2, HYG e His 3) característicos de esta familia de enzimas.

Las secuencias del metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia mostraron gran diversidad, pudiendo ser relacionadas con varios grupos filogenéticos conocidos y también con aquellos definidos en este trabajo. Por ejemplo, los genes descritos en miembros del filo

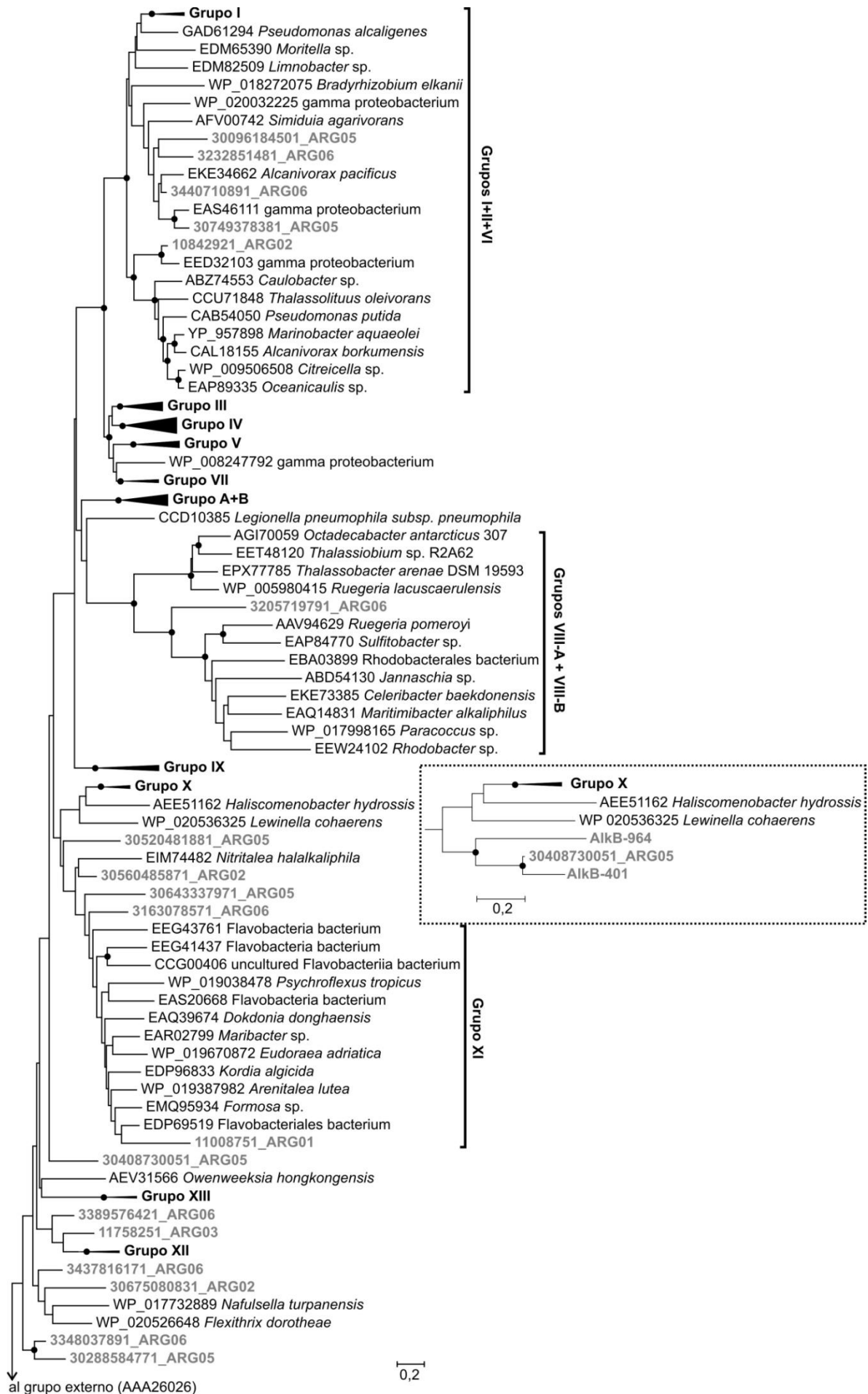
Proteobacteria (Grupos I+II+VI, Figuras 4.3.3, 4.3.5 y 4.3.6). No observamos secuencias relacionadas con los Grupos IV (AlkBs caracterizadas en Actinobacterias) y VII, y sólo una de las secuencias agrupó con las secuencias AlkM (Grupo V, Figura 4.3.4). Asimismo, observamos algunas secuencias que pudieron ser asignadas a los grupos de Monooxigenasas AlkB descritos en miembros de la familia Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria, Grupos VIII-A y VIII-B, Figuras 4.3.3, 4.3.4 y 4.3.5). Las secuencias relacionadas con Monooxigenasas AlkB reportadas en miembros del filo Bacteroidetes (Grupos IX-XIII) estuvieron entre las más abundantes de los sedimentos. Sin embargo, muchas no pudieron ser estrictamente clasificadas en los Grupos filogenéticos definidos, debido a la falta de un buen soporte de los mismos. Por ejemplo, secuencias cerca del Grupo XII en la Figura 4.3.3; y cerca de los Grupos XI, XII, y XIII en las Figuras 4.3.5 y 4.3.6. Las cuatro secuencias de longitud completa identificadas *in silico* también estuvieron relacionadas filogenéticamente con secuencias AlkB reportadas en miembros del filo Bacteroidetes (orden Flavobacteriales) (Grupos XI y XII) con altos valores de bootstrap (Figura 4.3.7). En particular, la secuencia 10080042\_ARG05 (Grupo XI) estaba relacionada con la Monooxigenasa AlkB proveniente del genoma secuenciado de *Eudoraea adriatica*, presentando un 80% de identidad, un 88% de similitud, y 100% como valor de bootstrap (Figura 4.3.7).



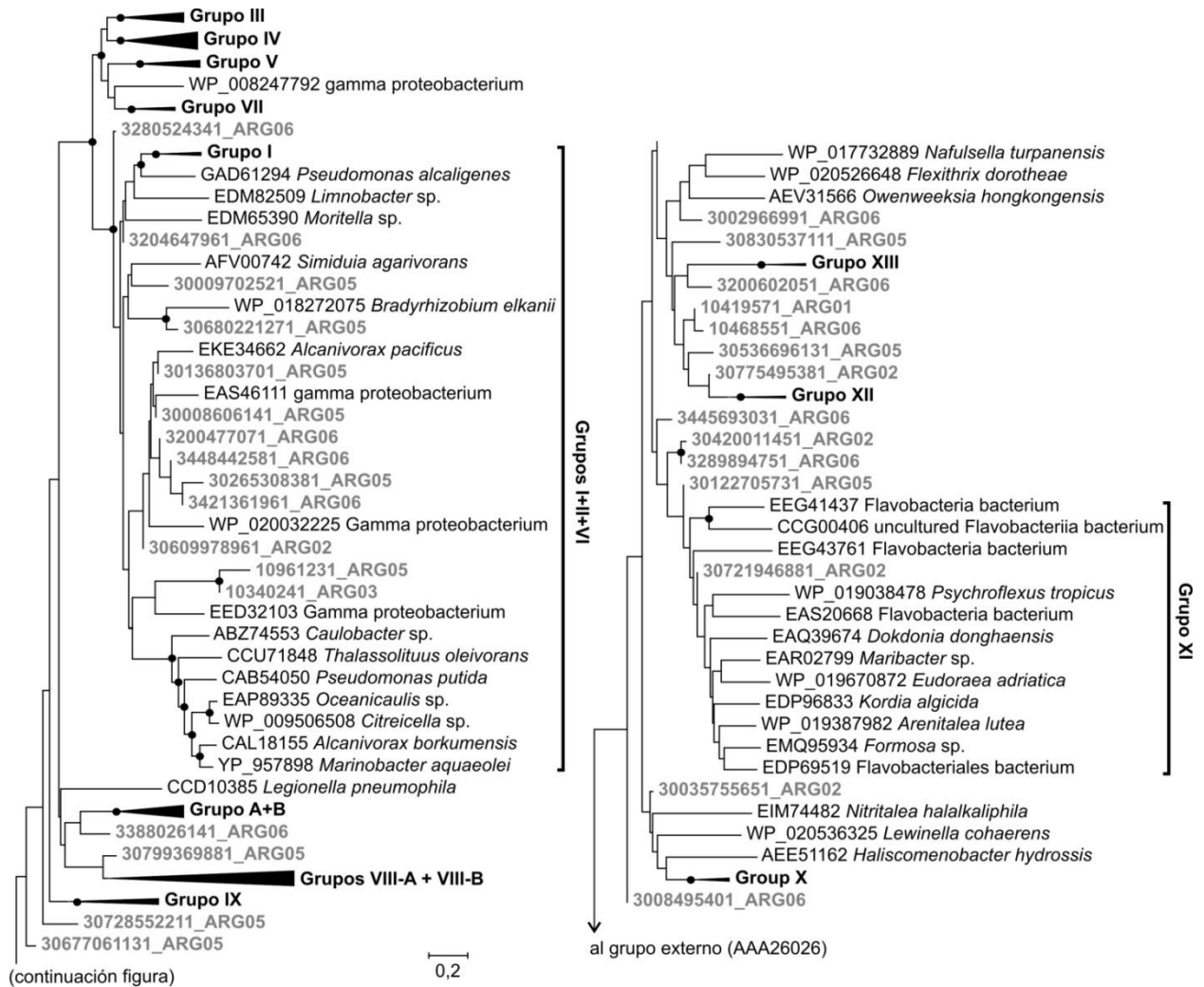
**Figura 4.3.3.** Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas y las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia identificadas *in silico* en este trabajo (en gris), correspondientes a la región de alineamiento Histidina 1 (51 secuencias). Los grupos utilizados en este trabajo (Grupos I a XIII y A+B) se muestran en negrita. Aquellos grupos que no poseían secuencias de este trabajo fueron colapsados para simplificar la figura. Los nombres de las secuencias comienzan con el número de acceso de Genbank (secuencias de referencia) o del IMG (secuencias de este trabajo). Los nodos donde se observaron valores de bootstrap  $\geq 70$  (1000 replicaciones) se indican con círculos negros. La barra de escala representa 0,2 sustituciones por sitio (20% de distancia en aminoácidos).



**Figura 4.3.4.** Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas y las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia identificadas *in silico* en este trabajo (en gris), correspondientes a la región de alineamiento Histidina 2 (12 secuencias).

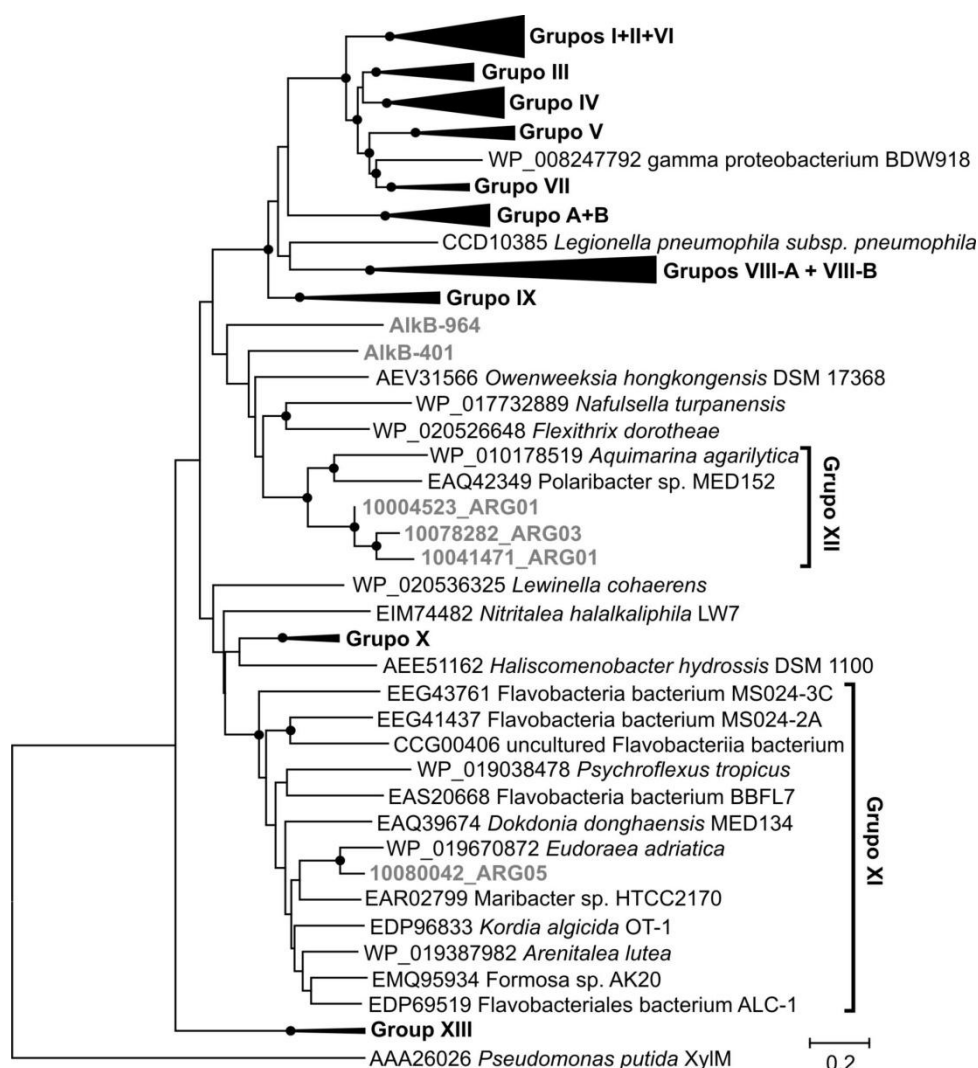


**Figura 4.3.5. (página anterior) Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas y las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia identificadas *in silico* en este trabajo (en gris), correspondientes a la región de alineamiento HYG (18 secuencias).**



**Figura 4.3.6. Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas y las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia identificadas *in silico* en este trabajo (en gris), correspondientes a la región de alineamiento Histidina 3 (31 secuencias).**

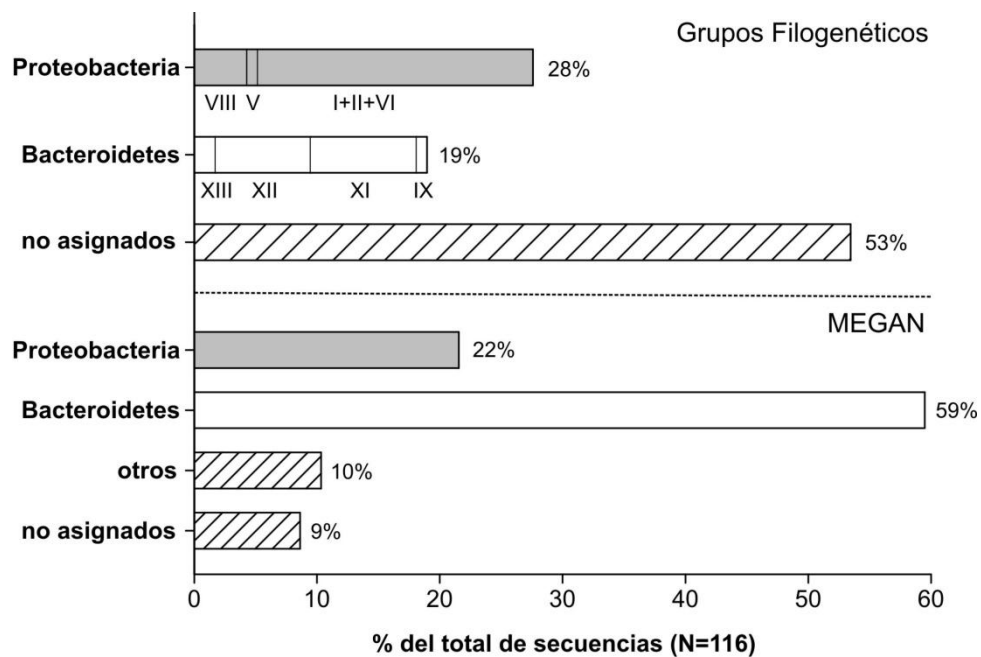




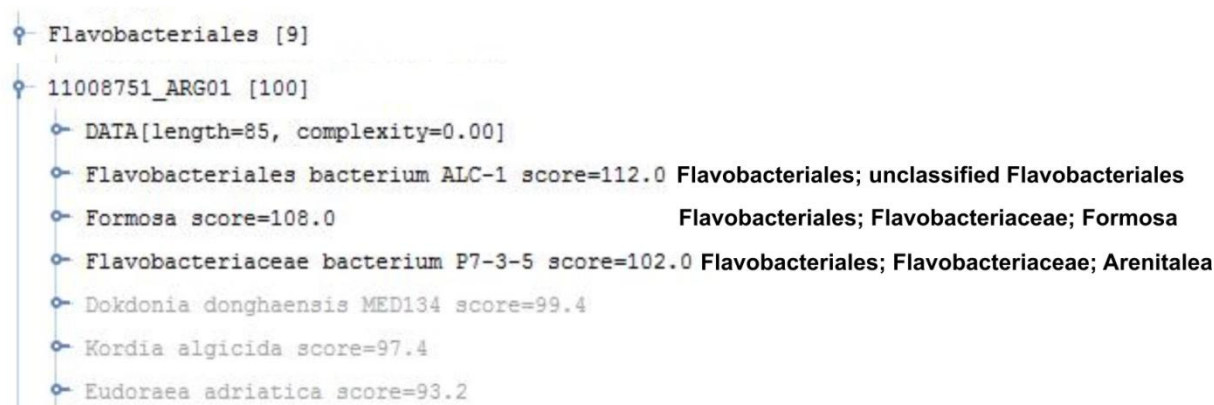
**Figura 4.3.7.** Árbol filogenético construido a partir de secuencias AlkB representativas, las secuencias AlkB del metagenoma de sedimentos marinos de Bahía Ushuaia identificadas *in silico* en este trabajo (en gris), de longitud completa (4 secuencias), y las dos secuencias identificadas en la biblioteca metagenómica OR07-BM (AlkB-401 y AlkB-964).

Al contabilizar las frecuencias observadas para cada grupo de secuencias AlkB, observamos que el 28% de las secuencias identificadas *in silico* fueron asignadas a los Grupos formados por AlkBs de miembros del filo Proteobacteria (Grupos I a VIII), mientras que el 19% fueron asignadas estrictamente a los Grupos formados por AlkBs de miembros del filo Bacteroidetes (Grupos IX a XIII) (Figura 4.3.8). Asimismo, el 53% de las secuencias identificadas *in silico* no pudieron ser asignadas a alguno de los Grupos filogenéticos definidos (categoría “sin asignar”, Figura 4.3.8). Las secuencias AlkB identificadas *in silico* también fueron procesadas mediante el software MEGAN4 (Huson, Mitra et al. 2011), el cual es utilizado para estimar y explorar interactivamente el contenido taxonómico de un set de datos metagenómicos. Para ello, en un primer paso las secuencias son comparadas contra alguna base

de datos de secuencias conocidas mediante BLAST o alguna otra herramienta comparativa. Luego, en un segundo paso, el software MEGAN4 procesa estos resultados, y los ordena de acuerdo a la taxonomía del NCBI, asignando cada secuencia al *ancestro común más bajo* (*lowest common ancestor*, LCA) del conjunto de secuencias (*hits*) encontradas al hacer la comparación mediante BLAST (Huson, Auch et al. 2007) (Figura 4.3.9). Con este método, aumentó el porcentaje de secuencias AlkB clasificadas como pertenecientes a miembros del filo Bacteroidetes (59%, Figura 4.3.8).



**Figura 4.3.8. Distribución de frecuencias de las secuencias AlkB identificadas *in silico*, basada en las clasificaciones utilizando los Grupos filogenéticos (arriba), y el software MEGAN (abajo).** La longitud de las barras horizontales representa el porcentaje de las secuencias asignadas a cada categoría. Los números romanos debajo de las barras horizontales se refieren a los Grupos filogenéticos definidos en la Figura 4.3.1. La categoría “otros” corresponde a la suma de secuencias clasificadas como Organismos celulares, Bacteria, y Procariotas no cultivados. Las categorías “no asignados” corresponden a la suma de secuencias que no pudieron ser clasificadas por cada método, por no cumplir con los parámetros establecidos. N: número de secuencias analizadas.



**Figura 4.3.9. Ejemplo de cómo el software MEGAN realiza la asignación taxonómica de las secuencias metagenómicas.** Se muestran los resultados de la comparación de la secuencia metagenómica 11008751\_ARG01 contra la base de datos no redundante de proteínas del NCBI. El software MEGAN realiza un consenso entre la taxonomía de los *hits* Flavobacteriales bacterium ALC-1, *Formosa* y Flavobacteriaceae bacterium P7-3-5 (en negro), y asigna la secuencia 11008751\_ARG01 al orden Flavobacteriales. A la derecha se indica la taxonomía del NCBI para estos *hits*, se puede observar que el nivel taxonómico más bajo común a los tres *hits* (*ancestro común más bajo*) corresponde al orden Flavobacteriales. Los *hits* marcados en gris no cumplen con los parámetros especificados (por ejemplo, su *score* está por debajo del umbral fijado), y por lo tanto no son tenidos en cuenta por el software MEGAN al realizar la asignación taxonómica.

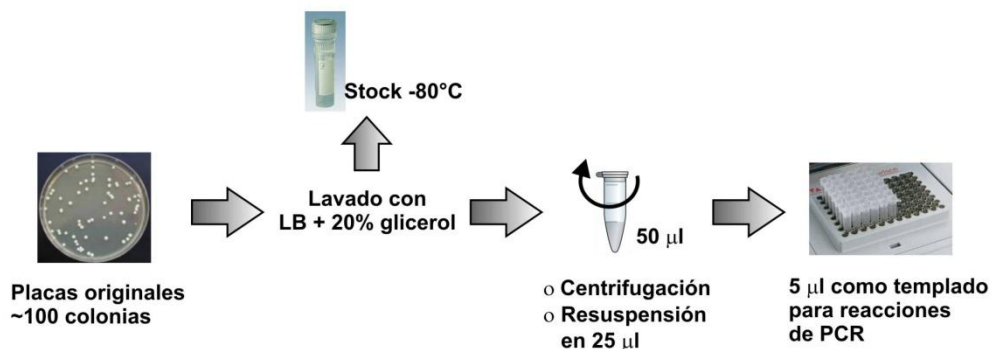
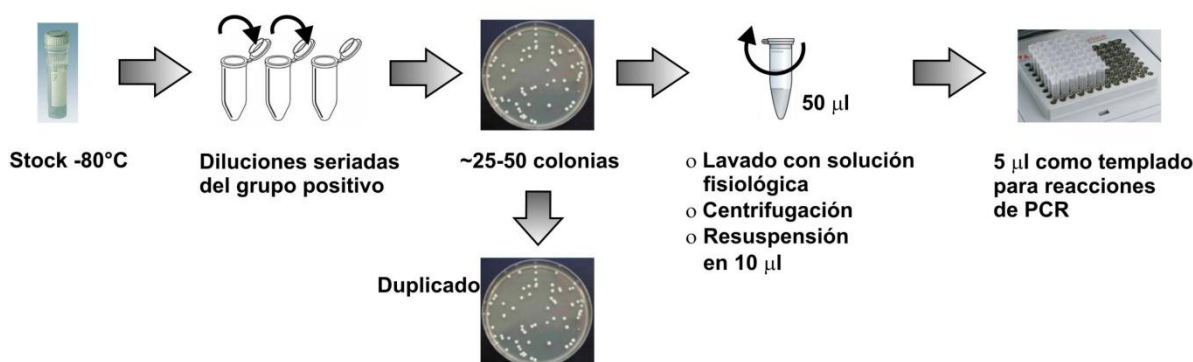
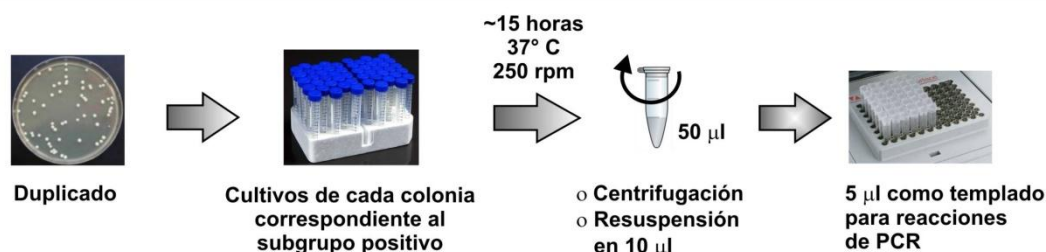
#### 4.3.2.2.2 Biblioteca metagenómica OR07-BM

##### 4.3.2.2.2.1 Identificación de fósmidos conteniendo genes *alkB*

La biblioteca metagenómica OR07-BM fue construida a partir del ADN metagenómico extraído de la muestra de sedimentos intermareales OR07 (Tabla 4.1.1, Resultados y discusión, Capítulo 1). Se obtuvieron un total de 46.000 clones, los cuales fueron almacenados en grupos de aproximadamente 100 clones, con un título de  $2 \times 10^6$  UFC (Unidades formadoras de colonias)/ $\mu\text{l}$ , es decir, cada clon está representado  $\sim 10^4$  veces en 1  $\mu\text{l}$ . La identificación de los clones de interés se realizó mediante reacciones de PCR, divididas en tres etapas, y utilizando el par de cebadores AlkB484F/AlkB824R (Tabla 3.3 y Sección 3.11.3, Materiales y Métodos). En la primera etapa, se identificaron los grupos positivos de  $\sim 100$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias) mediante reacciones de PCR utilizando como templado los sedimentos celulares correspondientes. Luego, en una segunda etapa, los grupos positivos fueron sembrados en subgrupos de  $\sim 25$ -50 UFC, las colonias fueron recolectadas lavando las placas con solución fisiológica, y los sedimentos celulares correspondientes fueron sometidos a reacciones de PCR en las mismas condiciones. Al identificar un subgrupo positivo, se realizaron cultivos líquidos a partir de cada colonia, y se prepararon nuevamente sedimentos celulares para utilizarlos como templado en las reacciones de PCR. Finalmente, los clones positivos individuales fueron

confirmados utilizando como templado extracciones de ADN fosmídico obtenidas con el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) (Figura 4.3.10).

En la primera etapa se realizaron 352 reacciones de PCR, y se observó el fragmento de amplificación del tamaño adecuado en cuatro grupos: #14, #31, #91 y #190. Estos grupos fueron confirmados como positivos repitiendo las reacciones de PCR a partir de diferentes templados (nuevos sedimentos celulares y/o preparaciones fosmídicas). Sin embargo, en la segunda etapa de búsqueda, sólo se encontraron subgrupos positivos para dos de los cuatro grupos iniciales: #14 y #190. Finalmente, se identificaron los clones individuales de los dos subgrupos, y se denominaron #401 y #964 (los números corresponden al número de clones que fue necesario sembrar en los subgrupos hasta su identificación).

**Etapas 1: Identificación de grupos positivos de ~100 clones****Etapas 2: Identificación de subgrupos positivos de ~25-50 clones****Etapas 3: Identificación de los clones individuales positivos**

**Figura 4.3.10.** Proceso de identificación de los clones conteniendo genes *alkB* en la biblioteca metagenómica OR07-BM.

#### 4.3.2.2.2 Análisis preliminares de los fósmidos #401 y #964

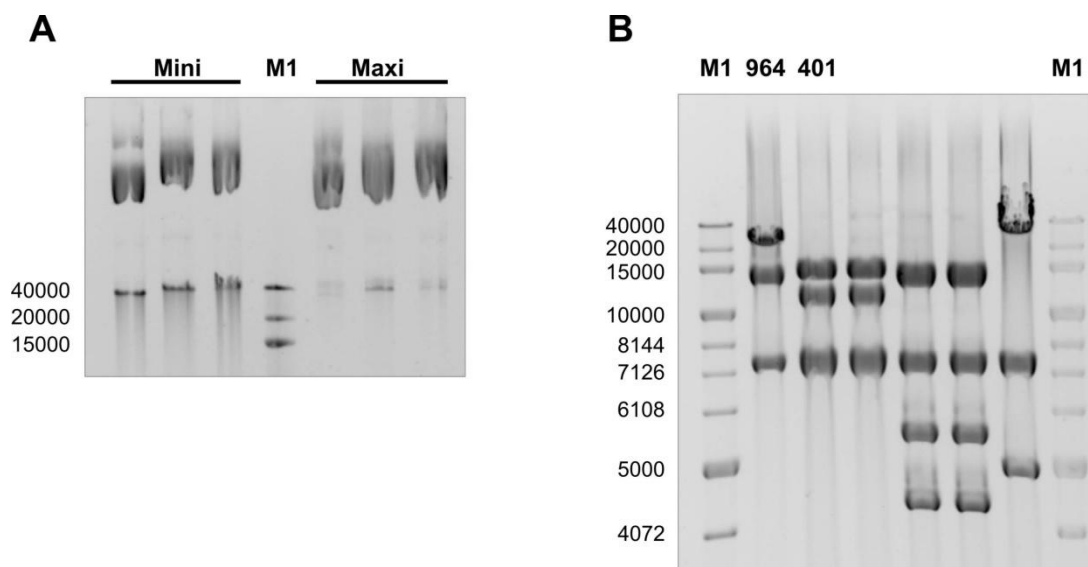
Una vez obtenidos los clones positivos, se evaluaron dos kits de purificación de ADN plasmídico de la compañía Qiagen, con diferentes volúmenes de cultivo inicial a procesar (QIAprep Miniprep Kit y QIAGEN Plasmid Maxi Kit), para realizar las extracciones de los fósmidos seleccionados para secuenciar. De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el QIAprep Miniprep Kit, ya que partiendo de un menor volumen inicial de cultivo y siendo por lo tanto más simple todo el procedimiento, se obtuvo un mejor rendimiento (Tabla

4.3.3 y Figura 4.3.11 A). También se realizó un corte con la enzima de restricción NotI a fin de verificar la liberación del inserto clonado y estimar su tamaño. A partir del patrón observado al separar los productos de la digestión mediante electroforesis, se estimó que los insertos tendrían un tamaño aproximado de 27 kb (#401) y 38 kb (#964) (Figura 4.3.11 B). Dado que los fósidos iban a ser secuenciados por pirosecuenciación 454, nos interesaba estimar el grado de contaminación con ADN genómico proveniente de la célula huésped de las preparaciones, a fin de evaluar cuanto podrían contribuir las lecturas “contaminantes” a las lecturas totales. Para ello, se realizaron ensayos de qPCR (PCR cuantitativa o en tiempo real) con blanco en el gen ARNr 16S, y se calculó que la relación entre la masa de ADN fósido y la masa de ADN genómico (observada para ocho preparaciones de diferentes fósidos) estuvo en el rango de 25-44. Esto indicaría que el número de lecturas “contaminantes” que podrían ser obtenidas durante la secuenciación no contribuirían significativamente a disminuir la cobertura de la secuencia de los fósidos.

**Tabla 4.3.3. Comparación entre los dos kits de purificación de ADN de la compañía Qiagen para la obtención de ADN fósido.**

|                                    | QIAprep Miniprep Kit | QIAGEN Plasmid Maxi Kit |
|------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Cultivo inicial de células (ml)    | 10                   | 250                     |
| Concentración* (ng/μl)             | 565 (121)            | 971 (140)               |
| Volumen final (μl)                 | 50                   | 400                     |
| μg totales*                        | 28 (6)               | 388 (56)                |
| Rendimiento* (μg/ml cultivo)       | 2,8 (0,6)            | 1,6 (0,2)               |
| A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> | 1,80 (0,02)          | 1,80 (0,01)             |

\*Valores promediados entre las extracciones de tres fósidos diferentes. Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis.



**Figura 4.3.11. A. Comparación entre las preparaciones de ADN fosmídico realizadas con los dos kits de purificación de QIAGEN: QIAprep Miniprep (Mini) y Plasmid Maxi (Maxi).** Se sembraron 300 ng de cada preparación. En el extremo izquierdo del gel se indican las pares de bases correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular (M1). **B.** Digestión con NotI a partir de 1 µg de cada preparación de ADN fosmídico. En el extremo superior del gel se nombran las calles correspondientes a las digestiones de los fósidos #964 y #401. El resto de las calles corresponden a otras digestiones de ADN fosmídico realizadas en el laboratorio.

#### 4.3.2.2.2.3 Secuenciación de los fósidos #401 y #964

Los fósidos #401 y #964 se secuenciaron por pirosecuenciación 454 en 1/8 de placa, junto con otros ocho fósidos también identificados en el laboratorio. Para 1/8 de placa se estimaba obtener un rendimiento de ~80.000-100.000 lecturas, según los datos de rendimiento promedio provistos por INDEAR (Rosario, Argentina). Considerando una longitud promedio de cada lectura de 300 pb, y una longitud promedio entre los ocho fósidos (estimada mediante digestión y electroforesis) de 40.000 pb, la cobertura estimada estaría en el rango de ~60-75X por fósido. El rendimiento real de la secuenciación fue de 95.819 lecturas, con una longitud promedio de 333 pb, y una longitud promedio de los fósidos de 42.994 pb. Por lo tanto, la cobertura real obtenida (74X) estuvo dentro del rango esperado. Todos los fósidos pudieron ser ensamblados en su totalidad – utilizando el software Newbler 2.6 (Margulies, Egholm et al. 2005) – y los insertos correspondientes a los fósidos #401 y #964 presentaron longitudes de 33,9 kb y 38,3 kb, respectivamente (Tabla 4.3.4). El tamaño del fósido #964 coincidió con el valor estimado mediante electroforesis. En cambio, el tamaño del fósido #401 fue mayor que el estimado. Como la diferencia observada es aproximadamente el tamaño del vector, posiblemente lo que sucedió fue que no tuvimos en cuenta la banda de ese tamaño por encontrarse superpuesta con la banda correspondiente al vector.

Para la predicción y anotación de los genes se utilizaron las plataformas automáticas ISGA (*Integrative Services for Genomics Analysis*) (Hemmerich, Buechlein et al. 2010), RAST y FGENESB (Solovyev V. and Salamov A. 2011), y se realizaron comparaciones contra las bases de datos del NCBI mediante los algoritmos blastp y blastn. Las anotaciones finales se realizaron manualmente, considerando el consenso entre estos resultados. En ambos fósidos se encontraron genes *alkB* de longitud completa (Tabla A1, Apéndice).

#### 4.3.2.2.4 Clasificación de las secuencias AlkB de los fósidos #401 y #964

Las secuencias AlkB de los fósidos #401 y #964, denominadas AlkB-401 y AlkB-964, respectivamente, contenían los cuatro motivos conservados de histidina, y seis segmentos transmembrana predichos. La ubicación relativa de estos segmentos transmembrana es igual a la reportada para las Alcano hidroxilasas de *Rhodococcus* sp. Q15 y *Pseudomonas putida* Gpo1 (Whyte, Smits et al. 2002; van Beilen, Smits et al. 2005), a excepción del último segmento predicho (Figura 4.3.12). Esto podría ser una diferencia real o podría deberse a un error en la predicción, ya que el software no predijo correctamente la posición del último segmento transmembrana para la secuencia AlkB de *Pseudomonas putida* Gpo1.

Las secuencias AlkB-401 y AlkB-964 mostraron 47% de identidad y 73% de similitud entre ellas, al nivel de la secuencia de aminoácidos. Al realizar una comparación mediante el algoritmo blastp contra la base de datos del NCBI, las secuencias más relacionadas correspondían a Alcano monooxigenasas descritas en miembros del filo Bacteroidetes, con identidades similares a las encontradas entre las dos secuencias metagenómicas. Por ejemplo, la secuencia AlkB-401 presentó 55% de identidad y 75% de similitud con la secuencia AlkB putativa de *Flexithrix dorotheae* (WP\_020526648), y la secuencia AlkB-964 presentó 51% de identidad y 70% de similitud con la secuencia AlkB putativa de *Nafulsella turpanensis* (WP\_017732889) (Tabla A2, Apéndice). Al utilizar el software MEGAN4, la secuencia AlkB-401 fue asignada al filo Bacteroidetes, mientras que la secuencia AlkB-964 sólo pudo ser asignada al dominio Bacteria. No fue posible asignar estas secuencias a alguno de los Grupos de secuencias AlkB del árbol de referencia (Figura 4.3.7).



**Rhodococcus** sp. Q15  
**Pseudomonas putida** GPo1  
A1KB-401  
A1KB-964

\_\_\_\_\_

**Rhodococcus** sp. Q15  
**Pseudomonas putida** GPo1  
AlkB-401  
AlkB-964

IV

**Rhodococcus** sp. Q15  
**Pseudomonas putida** GPo1  
AIKB-401  
AIKB-964

His 1

His 2

**Rhodococcus** sp. Q15  
**Pseudomonas putida** GPo1  
A1KB-401  
A1KB-964

---

**HYG**

VI

Y

**Rhodococcus** sp. Q15  
**Pseudomonas putida** GPo1  
AikB-401  
AikB-964

His 3

**Figura 4.3.12. (página anterior) Alineamiento de las secuencias AlkB de longitud completa obtenidas a partir de los fósidos #401 (AlkB-401) y #964 (AlkB-964), junto con las secuencias AlkB de *Rhodococcus* sp. Q15 (AAK97454), y *Pseudomonas putida* Gpo1 (CAB54050).** Se indican los cuatro motivos conservados de Histidina (línea continua: His 1, His 2, HYG, His 3), y los seis segmentos transmembrana (línea de puntos, numerados del I al VI), de acuerdo al trabajo de Whyte y colaboradores (Whyte, Smits et al. 2002). La línea discontinua muestra la ubicación del último segmento predicho para las secuencias AlkB de los fósidos, que es diferente a lo reportado para *Rhodococcus* sp. Q15 y *Pseudomonas putida* Gpo1. Los residuos conservados en un 80% y 100% en las secuencias mostradas se encuentran sombreados en gris y negro, respectivamente.

#### 4.3.2.3 Análisis del contexto genómico de los genes *alkB*

Se identificó el resto de los genes predichos y se analizó su organización, en los seis fragmentos genómicos que contienen genes *alkB* de longitud completa obtenidos en este trabajo: los dos fragmentos identificados en la biblioteca metagenómica OR07-BM (fósidos #401 y #964), y los cuatro fragmentos identificados *in silico* en el set de datos de secuenciación al azar (Tabla 4.3.4). Además, con el objetivo de dilucidar la posible identidad de los microorganismos de los que provenían estos fragmentos genómicos, se realizó una asignación taxonómica de los mismos utilizando métodos basados en la similitud. Por último, se realizaron comparaciones al nivel de la organización génica con los genomas más relacionados disponibles en las bases de datos.

##### 4.3.2.3.1 Asignación taxonómica

Para la asignación taxonómica de los fragmentos, se integraron los resultados obtenidos mediante los siguientes métodos: (1) comparación de las secuencias completas contra la base de datos de genomas del NCBI (mediante el algoritmo blastn); y clasificación taxonómica de los genes individuales predichos mediante el software MEGAN4 (2).

##### 4.3.2.3.1.1 Fragmentos genómicos identificados in silico

Los cuatro fragmentos genómicos obtenidos del set de datos de secuenciación al azar del metagenoma presentaron longitudes entre 1237 y 4043 pb, y por lo tanto, sólo se obtuvo la información de uno o dos genes acompañantes a los genes *alkB* (Tabla 4.3.4). Los fragmentos fueron clasificados como Familia Flavobacteriaceae (Filo Bacteroidetes) en la plataforma del IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>, donde se encuentran depositadas las secuencias), y uno de ellos (ARG05\_1008004) fue clasificado como perteneciente a *Maribacter* sp. HTCC2170. Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos al realizar la comparación

contra la base de datos de genomas del NCBI (Tabla 4.3.4). Asimismo, los resultados obtenidos con el software MEGAN4 también indicarían que los fragmentos se encuentran relacionados con miembros del filo Bacteroidetes (Tabla A4, Apéndice).

#### 4.3.2.3.1.2 Biblioteca metagenómica OR07-BM

Los fragmentos genómicos correspondientes a los fósidos #401 y #964 presentaron longitudes de 33,9 kb y 38,3 kb, respectivamente (Tabla 4.3.4). Las secuencias de nucleótidos de ambos fragmentos estuvieron relacionadas con genomas de microorganismos del filo Planctomycetes. El fragmento genómico #401 presentó valores de identidad entre 64 y 92% con el genoma de *Rhodopirellula baltica* SH 1 (BX119912). El fragmento genómico #964 fue más divergente con respecto a los genomas disponibles en la base de datos del NCBI, presentando valores de identidad y cobertura menores que los observados para #401. Las secuencias más relacionadas fueron los genomas de *Isosphaera pallida* ATCC 43644 (NC\_014962) (Tabla 4.3.4), *Planctomyces brasiliensis* DSM 5305 (NC\_015174), y *Planctomyces limnophilus* DSM 3776 (NC\_014148). En promedio, la mitad de los genes predichos en el fragmento genómico #401 fueron asignados al filo Planctomycetes (52%) mediante el software MEGAN4 (Tabla A2, Apéndice). Con respecto al fragmento genómico #964, un 36% de los genes predichos fueron asignados al filo Planctomycetes mediante el software MEGAN4 (Tabla A2, Apéndice). Asimismo, se encontró una secuencia de 976 pb correspondiente al gen ARNr 23S en el fragmento genómico #401 (23S ARNr-401), lo cual permitió avanzar más en la identificación de su posible origen. Al realizar el análisis filogenético correspondiente, se observó que esta secuencia agrupaba con un alto soporte con secuencias del género *Rhodopirellula* (filo Planctomycetes), mostrando un 91% de identidad con especies como *R. baltica* y *R. europaea* (Figura 4.3.13). En conjunto, nuestros resultados sugieren que los fragmentos genómicos #401 y 964# podrían pertenecer a microorganismos del filo Planctomycetes, y que el fragmento #401 podría pertenecer a un microorganismo relacionado con miembros del género *Rhodopirellula*. No existen registros de Alcano-1-monooxigenasas en miembros del filo Planctomycetes, por lo cual las secuencias AlkB identificadas en este trabajo podrían constituir las primeras descriptas para este grupo filogenético.

A la luz de esta información, nos preguntamos si algunas de las secuencias AlkB parciales identificadas *in silico* (sección 2.2.1) podrían estar relacionadas con secuencias AlkB del filo Planctomycetes, y no haber sido ser clasificadas como tales debido a la falta de secuencias AlkB descriptas en microorganismos de este filo. A fin de evaluar esta posibilidad, repetimos los

análisis filogenéticos incorporando las secuencias AlkB de los fósidos en todos los alineamientos construidos anteriormente. En efecto, una de las secuencias AlkB parciales identificadas *in silico* (30408730051\_ARG05) se encontró relacionada filogenéticamente con las secuencias AlkB de los fósidos (74% bootstrap, Figura 4.3.5 recuadro). Esta secuencia presentó un 84% y un 58% de identidad al nivel de aminoácidos con las secuencias AlkB-401 y AlkB-964, respectivamente. Asimismo, otras dos secuencias AlkB identificadas *in silico* (30801490191\_ARG02 y 30623914181\_ARG05) agruparon filogenéticamente con las secuencias AlkB de los fósidos, aunque con un valor menor de soporte de bootstrap (< 50%, datos no mostrados).

**Tabla 4.3.4. Características generales de los fragmentos genómicos conteniendo genes *alkB* de longitud completa.**

| Nombre                              | Long.<br>(pb) | GC<br>(%) | Genes<br>predichos | Genes<br>asignados <sup>(2)</sup> | blastn <sup>(3)</sup>                | C<br>(%) | Identidad <sup>(4)</sup><br>(%) |
|-------------------------------------|---------------|-----------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------|---------------------------------|
| <b>Fósmido #401</b>                 | 33.897        | 54        | 24                 | 15 <sup>(5)</sup>                 | <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1   | 33       | 64-92                           |
| <b>Fósmido #964</b>                 | 38.325        | 55        | 28                 | 20                                | <i>Isosphaera pallida</i> ATCC 43644 | 12       | 64-74                           |
| <b>ARG01_c1000452<sup>(1)</sup></b> | 4043          | 35        | 3                  | 3                                 | <i>Polaribacter</i> sp. MED152       | 33       | 68-70                           |
| <b>ARG01_c1004147<sup>(1)</sup></b> | 1237          | 33        | 2                  | 1                                 | <i>Polaribacter</i> sp. MED152       | 52       | 68                              |
| <b>ARG03_c1007828<sup>(1)</sup></b> | 1388          | 34        | 2                  | 1                                 | <i>Polaribacter</i> sp. MED152       | 51       | 68                              |
| <b>ARG05_1008004<sup>(1)</sup></b>  | 2824          | 36        | 3                  | 2                                 | <i>Maribacter</i> sp. HTCC2170       | 70       | 65-76                           |

*Abreviaturas:* Long., longitud. C., cobertura: fracción del fragmento genómico que es cubierto por el alineamiento con el genoma correspondiente de la base de datos.

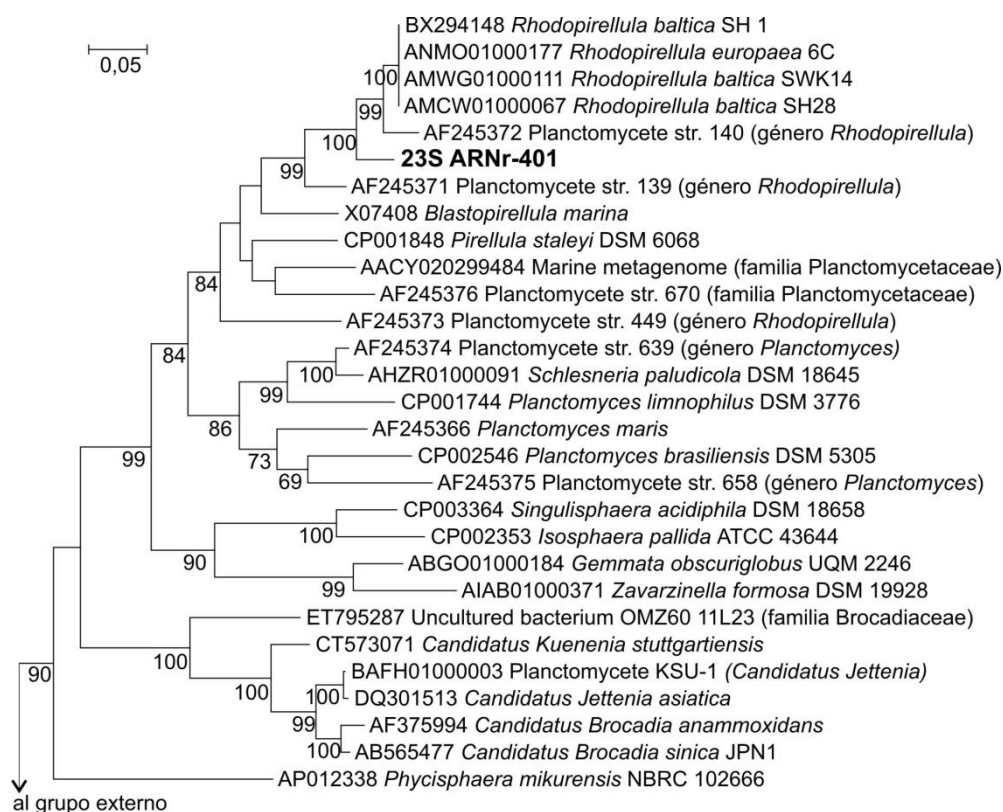
<sup>(1)</sup>Los nombres completos de los fragmentos genómicos identificados *in silico* son: TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1000452, TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1004147, TDF\_OR\_ARG03\_113mDRAFT\_c1007828, y TDF\_OR\_ARG05\_123mDRAFT\_1008004.

<sup>(2)</sup>Secuencias a las cuales se les pudo asignar una función putativa.

<sup>(3)</sup>Genoma con el mejor alineamiento, de acuerdo al resultado de la comparación mediante el algoritmo blastn contra la base de datos de Genomas del NCBI (los resultados fueron ordenados de acuerdo al porcentaje de cobertura).

<sup>(4)</sup>Rango de valores de identidad a nivel de nucleótidos como resultado de la comparación mediante el algoritmo blastn contra la base de datos de Genomas del NCBI.

<sup>(5)</sup>Incluyendo dos genes codificantes para ARNts y un fragmento del ARNr 23S.



**Figura 4.3.13. Análisis filogenético del fragmento del gen ARNr 23S presente en el fósido #401 (23S ARNr-401), y secuencias relacionadas de miembros del filo Planctomycetes.** El árbol fue construido utilizando el algoritmo Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) en el software MEGA 5. Los nombres de las secuencias comienzan con el número de acceso de Genbank. Se muestran los valores de bootstrap  $\geq 70\%$  (1000 replicaciones) debajo de las ramas correspondientes. Como grupo externo se utilizaron secuencias de miembros de los filos Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chlamydia, y Lentisphaera. La barra de escala representa 0,05 sustituciones por sitio (5% de distancia en nucleótidos).

#### 4.3.2.3.2 Organización génica y comparación con genomas relacionados

##### 4.3.2.3.2.1 Fragmentos genómicos identificados in silico

Debido a la corta longitud de los fragmentos genómicos identificados *in silico*, se obtuvo poca información del contexto genómico de los genes *alkB* identificados mediante esta estrategia (Figura 4.3.14 A). En los dos fragmentos de menor longitud, ARG01\_c1004147 y ARG03\_c1007828, se predijeron proteínas hipotéticas adyacentes a los genes *alkB* (Tabla A3, Apéndice). Estas proteínas hipotéticas presentaron un 84% de identidad y un 88% de similitud entre ellas. Las proteínas AlkB correspondientes (ARG01\_10041471 y ARG03\_10078282) presentaron un 83% de identidad y un 92% de similitud entre ellas. La misma organización génica del fragmento ARG05\_1008004 se observó en los genomas de *Maribacter* sp. HTCC2170 y *Eudoraea adriatica* DSM 19308, en este último caso con una inversión en la orientación de los genes (Figura 4.3.14 A). Adyacente al gen *alkB* se observó una glutamil-ARNt sintetasa (EC: 6.1.1.17) y una proteína hipotética (Tabla A3, Apéndice). Con respecto al

fragmento de mayor longitud, ARG01\_c1000452, no se encontraron similitudes en la organización génica con ninguna región de los genomas disponibles en el sitio IMG/M.

#### 4.3.2.3.2.2 Biblioteca metagenómica OR07-BM

En el fragmento genómico del fósido #401 se predijeron 21 secuencias codificantes para proteínas, de las cuales 15 pudieron ser asignadas a una función determinada (putativa), con mayor o menor grado de evidencia, mientras que las restantes permanecieron con la denominación de “proteínas hipotéticas” (Tabla 4.3.4 y Tabla A1 del Apéndice). Asimismo, (como ya se mencionó) se observó un fragmento correspondiente al gen ARNr 23S, y dos genes codificantes para ARNt (Tabla A1, Apéndice). En el fragmento genómico #964 se predijeron 28 secuencias codificantes para proteínas, de las cuales 20 pudieron ser asignadas a una función determinada (putativa), mientras que las restantes permanecieron con la denominación de “proteínas hipotéticas” (Tabla A1, Apéndice). En general, las proteínas predichas estarían involucradas en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, 80% de los genes asignados a una función pudieron ser clasificados dentro de categorías funcionales COG (*Clusters of Orthologous Groups*) (Tatusov, Galperin et al. 2000). Estas fueron: “Producción y conversión de energía” (*Energy production and conversion*, [C], 2 genes), “Transporte y metabolismo de carbohidratos” (*Carbohydrate transport and metabolism*, [G], 3 genes), “Transporte y metabolismo de aminoácidos” (*Amino acid transport and metabolism*, [E], 2 genes), “Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios” (*Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism*, ([Q], 3 genes), “Mecanismos de transducción de señales” (*Signal transduction mechanisms*, ([T], 1 gen), “Biogénesis del envoltorio celular, membrana externa” (*Cell envelope biogenesis, outer membrane*, [M], 3 genes), “Traducción, estructura ribosomal y biogénesis” (*Translation, ribosomal structure and biogenesis*, [J], 3 genes), “Transcripción” (*Transcription*, [K], 2 genes), “Replicación, recombinación y reparación del ADN” (*DNA replication, recombination, and repair*, [L], 2 genes), “Modificación post-transcripcional” (*Post-translational modification, protein turnover, chaperones*, [O], 3 genes), “Metabolismo de Lípidos” (*Lipid metabolism*, [I], 2 genes) y “Predicción general” o “Función desconocida” (*General function prediction, Unknown function*, [R] y [S], 3 y 1 genes respectivamente).

Asimismo, tampoco se observó un operón completo para los genes posiblemente involucrados en la degradación de alcanos, si bien se observaron genes cercanos a los genes *alkB* que podrían estar relacionados con esta vía. En el fragmento genómico #401, el gen *alkB* está

flanqueado por un regulador transcripcional putativo de la familia tetR (CDS 47), y una acil coenzima A sintetasa putativa (EC 6.2.1.3, gen *fadD2*, Figura 4.3.14 B). Debido a su cercanía, *alkB* y el regulador tetR podrían estar formando un operón, de acuerdo a una predicción hecha con el software en línea FGENESB (Solovyev V. and Salamov A. 2011). Este mismo software predijo un operón en el fragmento genómico #964 formado por los genes codificantes para la proteína AlkB, una proteína de la familia de las fosfotransferasas (CDS 0), una aldehído deshidrogenasa (gen *alh*), y una proteína hipotética (CDS 3) (Figura 4.3.14 B). Entre estas proteínas predichas, las enzimas aldehído deshidrogenasa y acil-CoA-sintetasa podrían estar catalizando, respectivamente, la tercer y cuarta reacción correspondientes a la vía *alk* de degradación aeróbica de alcanos (Figura 2.2 Introducción). Estas reacciones son la oxidación de los aldehídos grasos a ácidos grasos, y la esterificación de los ácidos grasos en CoA tioésteres metabólicamente activos (Rojo 2010). La reacción de activación de alcanos mediada por AlkB se encuentra dentro de la categoría “Degradación de ácidos grasos” (*Fatty acid degradation*), y a su vez dentro de la categoría mayor “Metabolismo de lípidos” (*Lipid metabolism*), de acuerdo a la base de datos de vías del KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Corriente arriba del gen *alkB*-401 se predijeron otros dos genes que podrían estar relacionados con el metabolismo de lípidos: el CDS 40, una hidrolasa de esteres carboxílicos, y el CDS 43, una lipasa (Figura 4.3.14 B).

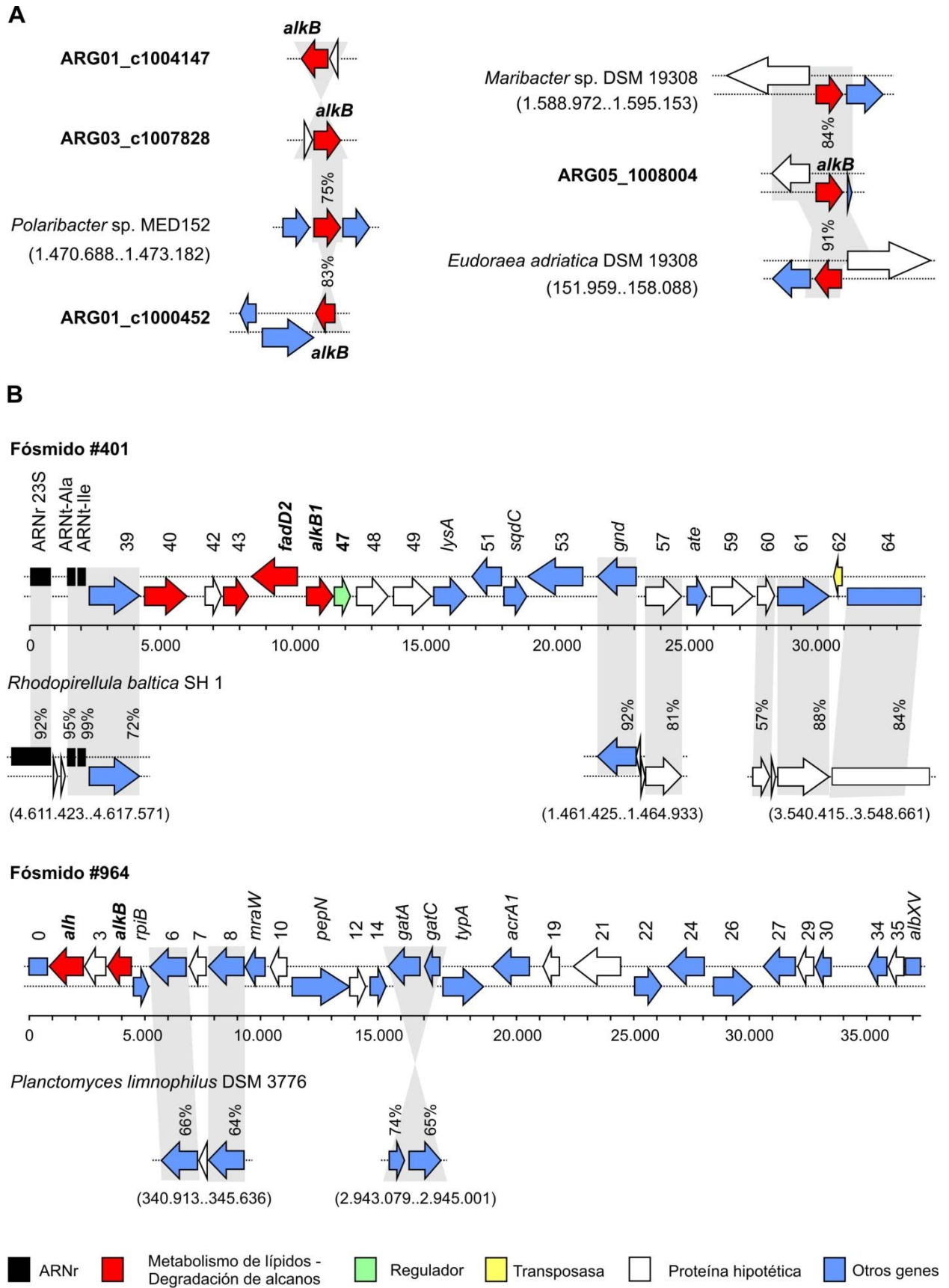
Los resultados de la asignación taxonómica indican que el fósido #401 podría provenir de un microorganismo del género *Rhodopirellula* (sección 2.3.1.2), y por lo tanto se realizó una comparación al nivel de la organización génica con el genoma de *Rhodopirellula baltica* SH 1 (BX119912), el cual estaba disponible en la base de datos SEED (<http://rast.nmpdr.org/>, donde fueron depositadas las secuencias de los fósidos). Se observaron tres regiones con un orden conservado, aunque no se encontraban contiguas en el genoma. La primer región abarca el fragmento del gen ARNr 23S, los dos genes ARNt, y el CDS 39 (tioredoxina putativa). La segunda región abarca el gen *gnd* (6-fosfogluconato deshidrogenasa) y el CDS 57 (proteína hipotética). La tercer región abarca el CDS 60 (proteína hipotética), el CDS 61 (proteína integral de membrana posiblemente involucrada en la regulación de la conductancia de cationes), y el CDS 64 (probable ATPasa) (Tabla A1 del Apéndice y Figura 4.3.14 B).

La secuencia del fósido #964 se comparó con el genoma de *Planctomyces limnophilus* DSM 3776 (NC\_014148), también disponible en la base de datos SEED. En este caso, se observó una región con la misma organización génica que abarca el CDS 6 (proteína de división celular FtsI), y el CDS 8 (proteína con un dominio lysM, podría estar involucrada en la degradación de la pared celular). Además, se observó una región con una organización génica

invertida que abarca los genes *gatA* y *gatC* (amidotransferasas, subunidades A y C, respectivamente) (Figura 4.3.14 B).

Para ambos fósidos, la región correspondiente al gen *alkB* y genes lindantes no pudo ser comparada con los genomas disponibles de microorganismos del filo Planctomycetes, algo que ya veníamos observando en nuestros análisis, ya que hasta el momento no se han reportado los genes *alkB* en los pocos genomas secuenciados de miembros de este filo.





**Figura 4.3.14. Organización génica de los fragmentos genómicos conteniendo genes *alkB* de longitud completa, y comparación con genomas relacionados. A. Fragmentos identificados *in silico*. Los nombres completos de los contigs son: TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1004147, TDF\_MC\_ARG01\_113mDRAFT\_c1000452,**

TDF\_OR\_ARG03\_113mDRAFT\_c1007828, y TDF\_OR\_ARG05\_123mDRAFT\_1008004. **B. Fragmentos obtenidos de la biblioteca metagenómica OR07-BM.** La longitud y la dirección de las flechas indican el tamaño relativo y la dirección de transcripción de cada gen predicho. Por encima de cada flecha, se indican los nombres de los genes correspondientes en los casos que pudieron ser asignados, o en caso contrario, se indican con números consecutivos (para más información ver Tablas A1-4 del Apéndice). Las regiones donde se observó una organización génica compartida (sintenia) con los genomas más cercanos fueron sombreadas en gris. Se indican los valores de identidad (%) al nivel de la secuencia de nucleótidos entre los genes codificantes para ARN comparados, y los valores de similitud (%) al nivel de la secuencia de aminoácidos entre las proteínas comparadas. Entre paréntesis se indican las posiciones relativas de las regiones comparadas en los genomas más cercanos identificados.

### 4.3.3 DISCUSIÓN

Las dos técnicas para analizar un metagenoma utilizadas en este capítulo presentan sus ventajas y limitaciones. La secuenciación al azar del metagenoma permite generar información *de novo*, y por lo tanto, es posible obtener información de microorganismos que antes no podían ser muestreados (Eisen 2007). Sin embargo, en comunidades microbianas complejas, el proceso de ensamblado puede ser ineficiente, y como consecuencia, el set de datos resultante estará compuesto mayoritariamente por secuencias cortas (Wooley and Ye 2009). Por otro lado, mediante la construcción de una biblioteca metagenómica en fósidos es posible obtener fragmentos grandes del metagenoma, lo cual brinda información de los genes y su contexto genómico. El hecho de tener los fragmentos clonados significa una ventaja, ya que tiene el potencial de revelar módulos metabólicos, cuya función enzimática puede ser analizada en estudios posteriores (Gomez-Pereira, Schuler et al.). Sin embargo, en comunidades complejas la biblioteca metagenómica deberá contener un gran número de clones para poder encontrar aquellos conteniendo los genes de interés (Uchiyama and Miyazaki 2009). Asimismo, se han observado diferencias respecto a la información obtenida mediante la secuenciación del metagenoma antes y después del clonado en fósidos, posiblemente debido al hecho de que ciertos fragmentos se clonen diferencialmente respecto a otros, afectando la representatividad de la comunidad natural (Temperton, Field et al. 2009; Ghai, Martin-Cuadrado et al. 2010). Por otro lado, los métodos de búsqueda (*screening*) tanto moleculares como funcionales de las bibliotecas metagenómicas presentan sus limitaciones. De hecho, el ensayo molecular utilizado mostró una muy baja eficiencia de recuperación (2 clones de 46.000), y no encontramos un ensayo en placa que nos permitiera visualizar la actividad Alcano monooxigenasa AlkB en placa de manera de utilizarlo para realizar un *screening* funcional de la biblioteca metagenómica.

En este trabajo, las secuencias *alkB* identificadas *in silico* (secuenciación al azar del metagenoma) fueron más abundantes respecto a aquellas identificadas en la biblioteca

metagenómica. Ambas secuencias *alkB* identificadas en la biblioteca metagenómica fueron de longitud completa, mientras que las secuencias *alkB* identificadas *in silico* fueron mayoritariamente secuencias parciales. La corta longitud de las secuencias identificadas *in silico* probablemente se deba a la baja eficiencia en el ensamblado, debido a la alta complejidad de las comunidades de sedimentos de Bahía Ushuaia. De hecho, el porcentaje de secuencias ensambladas fue 8,46% en promedio para las seis muestras. Este fue el menor valor en comparación con los otros sitios analizados del proyecto.

Realizamos una clasificación actualizada de la familia de Alcano monooxigenasas AlkB, incluyendo secuencias derivadas de proyectos genómicos de miembros de los filos Proteobacteria y Bacteroidetes, recientemente publicados en las bases de datos. A partir de los trabajos anteriores, se habían descripto mayormente seis grupos filogenéticos de secuencias AlkB, relacionados con microorganismos de los filos Proteobacteria y Actinobacteria (Heiss-Blanquet, Benoit et al. 2005; Wang, Wang et al. 2010). Luego de nuestro análisis, fue posible identificar un total de quince grupos, ampliando a más del doble el espectro de diversidad filogenética del gen *alkB*. Se definieron dos grupos nuevos con AlKBs de miembros de la clase Gammaproteobacteria (Grupo VI y VII), otros dos grupos con AlKBs de miembros de la familia Rhodobacteraceae (clase Alphaproteobacteria) (Grupos VIII-A y VIII-B), y cinco grupos con AlKBs de miembros del filo Bacteroidetes (Grupos IX-XIII).

De acuerdo a esta clasificación, las variantes AlkB identificadas *in silico* en los metagenomas de los sedimentos de Bahía Ushuaia pudieron ser relacionadas mayoritariamente con secuencias descriptas en microorganismos de los filos Proteobacteria (clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria) y Bacteroidetes (clase Flavobacteriia). En particular, el 22% de las secuencias AlkB identificadas *in silico* agruparon dentro del clado monofilético denominado Grupos I + II + VI. Este clado está formado mayoritariamente por secuencias reportadas en Gammaproteobacterias, incluyendo bacterias marinas especializadas en la degradación de hidrocarburos alifáticos (*Alcanivorax*, *Marinobacter*). Se ha determinado el rango de los sustratos utilizados por tres Alcano hidroxilasas de este clado. Las Alcano hidroxilasas de *Pseudomonas putida* y *Alcanivorax borkumensis* (Grupo II) son capaces de degradar alcanos desde C<sub>5</sub> hasta C<sub>12</sub> o C<sub>13</sub> (van Beilen, Marin et al. 2004; van Beilen, Smits et al.). En cambio, las Alcano hidroxilasas del Grupo I podrían ser responsables de la degradación de alcanos hasta C<sub>16</sub>, como se observó para una de las enzimas de *Alcanivorax dieselolei* B-5 (ACZ6280) (Liu, Wang et al. 2011). Asimismo, en este clado se encuentran secuencias derivadas de proyectos genómicos de microorganismos sobre los que no se dispone información de su capacidad degradativa de hidrocarburos, o de los genes involucrados (Grupo VI, por ejemplo).

Por otro lado, el 4% de las secuencias AlkB identificadas *in silico* fueron clasificadas como Grupos VIII-A y VIII-B. Las secuencias *alkB* de estos grupos están reportadas en proyectos genómicos, sin estudios funcionales hasta el momento. Es interesante destacar que los microorganismos hospedadores son mayoritariamente miembros del clado Roseobacter (familia Rhodobacteraceae, clase Alphaproteobacteria) el cual es ubicuo en el ecosistema marino (Buchan and González 2010; Kim and Kwon 2010). Varios estudios han relacionado a los miembros de este clado con la biodegradación de hidrocarburos. Mediante técnicas independientes del cultivo, se observó que son uno de los grupos que proliferan en experimentos controlados de exposición a hidrocarburos (enriquecimientos con petróleo crudo (Brakstad and Lodeng 2005; Coulon, McKew et al. 2007), gasoil (Lanfranconi, Bosch et al. 2010), o alcanos (McKew, Coulon et al. 2007)). En los genomas secuenciados de miembros de este grupo de microorganismos se identificó la presencia de genes codificantes para enzimas involucradas en la degradación de alcanos, así como también vías para la degradación aeróbica de compuestos aromáticos (Buchan and González 2010). Harwati y colaboradores (Harwati, Kasai et al. 2007) obtuvieron aislamientos a partir de agua de mar (Puerto Semarang, Isla de Java, Indonesia) y evaluaron su capacidad para degradar componentes del petróleo crudo (*n*-alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>35</sub>, alquilnaftalenos, alquilfluorenos, alquilfenantrenos, y alquildibenzotiofenos). Entre los aislamientos obtenidos, aquellos identificados como pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria fueron los más abundantes, y al menos uno de ellos con la capacidad de degradar alcanos podría estar relacionado con el clado Roseobacter (*Roseivivax halodurans*).

Los miembros del filo Bacteroidetes son el grupo más abundante de bacterias marinas después de los filos Proteobacteria y Cyanobacteria. Se han encontrado principalmente asociados a partículas marinas (detritos o algas), donde utilizan compuestos de alto peso molecular como fuente de carbono y energía (Fernandez-Gomez, Richter et al. 2013). Asimismo, se han obtenido clones (Chang, Stephen et al. 2000; LaMontagne, Leifer et al. 2004) y aislamientos (Alonso-Gutiérrez, Figueras et al. 2009) a partir de diferentes ambientes marinos con hidrocarburos. De los aislamientos obtenidos, el mejor caracterizado es *Yeosuana aromativorans*, una bacteria marina que degrada hidrocarburos poliaromáticos (Kwon, Lee et al. 2006). Además, se han identificado dos microorganismos capaces de degradar alcanos de cadena larga: *Flavobacterium* DS-711 (hasta C<sub>25</sub>) (Moriya and Horikoshi 2002), aislado a partir de sedimentos marinos profundos, y *Weeksella* sp. (hasta C<sub>34</sub>) (Yuste, Corbella et al. 2000), aislado a partir de suelos contaminados con petróleo crudo. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, existen una variedad de secuencias *alkB* identificadas en genomas de microorganismos de este filo, por lo cual se estima que existen muchos microorganismos capaces de degradar alcanos mediante

enzimas AlkB que aún no han sido caracterizados. En este trabajo, un 19% de las variantes AlkB identificadas *in silico* fueron clasificadas dentro de grupos que contenían AlkB de miembros del filo Bacteroidetes, en su mayoría de la clase Flavobacteriia (Grupos XI y XII). Tal es el caso de las cuatro variantes AlkB de longitud completa, que estuvieron relacionadas filogenéticamente con las secuencias AlkB de los genomas de *Aquimarina agarilytica* ZC1, *Polaribacter* sp. MED152 (Grupo XII), y *Eudoraea adriática* (Grupo XI). Las AlkB de los Grupos XI y XII se encuentran disponibles sólo a partir de los proyectos de secuenciación genómica, y no se han reportado estudios funcionales sobre las mismas.

Un gran porcentaje de las variantes AlkB identificadas *in silico* no pudieron ser clasificadas en los Grupos filogenéticos definidos (53%). Sin embargo, mediante el sistema de asignación taxonómica del software MEGAN, muchas de estas secuencias fueron clasificadas como pertenecientes a microorganismos del filo Bacteroidetes. La asignación del software MEGAN se basa en un algoritmo menos estricto que la clasificación basada en árboles filogenéticos, y en ese sentido el análisis filogenético es más conservador.

Una de las secuencias AlkB identificadas en la biblioteca metagenómica, AlkB-401, también fue clasificada como perteneciente a un microorganismo del filo Bacteroidetes mediante el software MEGAN, mientras que AlkB-964 sólo pudo ser asignada al dominio Bacteria (Tabla A2, Apéndice). En los análisis filogenéticos, no observamos una relación clara de estas secuencias con respecto a las secuencias disponibles en las bases de datos, por lo que no pudieron ser clasificada dentro de los Grupos filogenéticos definidos. Más aun, los fragmentos genómicos de donde derivan AlkB-401 y AlkB-964 demostraron estar relacionados con los genomas de microorganismos del filo Planctomycetes. En particular, el fragmento #401 podría derivar de un microorganismo del género *Rhodopirellula*, de acuerdo a la presencia de una secuencia parcial del gen ARNr 23S (Ward, Rainey et al. 2000). Estos resultados sugieren que la asignación taxonómica del software MEGAN pudo haber estado desviada por la falta de secuencias AlkB del filo Planctomycetes en la base de datos del NCBI. De todos modos, también existe la posibilidad de que la secuencia AlkB-401 haya sido adquirida por transferencia horizontal desde un miembro del filo Bacteroidetes, ya que se encontró una secuencia correspondiente a una transposasa en este fragmento. La transferencia horizontal juega un papel importante en la distribución de los genes *alkB* entre las bacterias y, por lo tanto, los árboles filogenéticos basados en el gen *alkB* no siempre reflejan las relaciones filogenéticas entre los microorganismos portadores de dichos genes (van Beilen, Z. et al. 2003; Giebler, Wick et al. 2013). Sin embargo, de haber sido adquirido por transferencia horizontal, en principio este no sería un evento reciente ya que las similitudes no son altas. Por otro lado, el contenido de GC

promedio de las secuencias de los fósidos (54-55%) era similar al promedio de los Planctomycetes según se deriva de los genomas depositados en IMG (55.64%, [www.img.jgi.doe.gov](http://www.img.jgi.doe.gov)), y no se encontraron anomalías en el contenido de GC en la región correspondiente a las secuencias *AlkB*, lo cual sugiere que no ha habido un evento reciente que haya impactado sobre las propiedades intrínsecas del ADN esta región génica.

La organización de los genes *alk* involucrados en la oxidación de alcanos varía significativamente entre las diferentes bacterias degradadoras. En muchos casos, los genes de la vía de degradación se encuentran dispersos a lo largo del genoma. Por ejemplo, en *Acinetobacter* sp. ADP1 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, los genes codificantes para las otras dos subunidades del complejo enzimático Alcano hidroxilasa, Rubredoxina y Rubredoxina reductasa, no se encuentran cerca del gen *alkB*, probablemente debido a que también participan en otras vías oxidativas (Figura 2.3, Introducción) (Tani, Ishige et al. 2001; Smits, Witholt et al. 2003; van Beilen, Z. et al. 2003). En otros casos se ha observado un agrupamiento de todos los genes de la vía, como es el caso del plásmido OCT de *Pseudomonas putida* Gp1, donde los genes *alk* se encuentran formado dos operones: *alkBFGHJKL* y *alkST* (van Beilen, Wubbolts et al. 1994) (Figura 2.2, Introducción). Asimismo, se han observado organizaciones similares en bacterias marinas “especialistas” en la degradación de hidrocarburos, o hidrocarbonoclasticas, como ser *Alcanivorax borkumensis*, *Marinobacter aquaeolei*, y *Thalassolituus oleivorans* (Figura 2.3, Introducción). Las bacterias hidrocarbonoclasticas poseen en general un metabolismo limitado, pudiendo utilizar como fuente de carbono principal los hidrocarburos (aromáticos y alifáticos), y adicionalmente algunos ácidos orgánicos de bajo peso molecular y aminoácidos (Gauthier, Lafay et al. 1992; Yakimov, Golyshin et al. 1998; Huu, Denner et al. 1999; Yakimov, Gentile et al. 2004).

En general, no observamos una vía completa de degradación de alcanos en los fragmentos genómicos analizados conteniendo genes *alkB* de longitud completa, ya sean los fragmentos identificados *in silico* (ARG01\_c1000452, ARG01\_c1004147, ARG03\_c1007828, ARG05\_1008004) o los fósidos de la biblioteca metagenómica (Fósidos #401 y 964). En la secuencia del fósido #401, adyacente al gen *alkB* observamos un gen codificante para una proteína reguladora putativa de la familia TetR. Los genes codificantes para reguladores del tipo TetR –en algunos estudios denominados *alkU*– se han observado junto a genes *alkB* mayormente en bacterias degradadoras de alcanos pertenecientes al filo Actinobacteria, como ser *Prauserella rugosa* NRRL B-2295 (Smits, Balada et al. 2002), *Nocardioides* sp. CF8 (Hamamura, Yeager et al. 2001), y algunas cepas del género *Rhodococcus* (Whyte, Smits et al. 2002; Cappelletti, Fedi et al. 2011), entre otras. Por otro lado, también se ha reportado en una Gammaproteobacteria

marina, *Alcanivorax hongdengensis* A-11-3 (Wang and Shao 2012). Sin embargo, son escasos los estudios sobre el rol de esta familia de reguladores en el metabolismo de alcanos. Mediante estudios de expresión (por RT-PCR en tiempo real) en *Dietzia cinnamea* P4 (Actinobacteria), Procópio y colaboradores concluyeron que el gen *alkU* –regulador de la familia TetR putativo– sería responsable de la inducción de otros dos genes involucrados en el metabolismo de alcanos: *alkB* y un gen codificante para un transportador de lípidos putativo (Procópio, de Cassia Pereira e Silva et al. 2013).

Como ya se mencionó, nuestros análisis de asignación taxonómica indicarían que las secuencias de los fósidos #401 y 964 pertenecerían a microorganismos del filo Planctomycetes. Los miembros del filo Planctomycetes se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente marino, donde se ha sugerido que utilizan heteropolisacáridos sulfatados complejos como fuente de carbono y energía (Glockner, Kube et al. 2003; Woebken, Teeling et al. 2007). En cuanto a su relación con la degradación de hidrocarburos, el único estudio corresponde al trabajo de Pereira y colaboradores, donde observaron que siete aislamientos del filo Planctomycetes fueron capaces de crecer en presencia de diferentes mezclas de hidrocarburos (diesel, gasolina sin plomo, petróleo, aceite de turbinas, fueloil y tolueno) (Pereira, Terenziani et al. 2010). Al comparar las secuencias de los fósidos con los genomas más relacionados –*Rhodopirellula baltica* SH 1 y *Planctomyces limnophilus* DSM 3776– observamos algunas regiones con la misma organización génica, si bien las regiones encontradas abarcaban menos de la mitad de la longitud total de los fósidos (33% de cobertura para #401, y 12% para #964). En particular, la región correspondiente al gen *alkB* y genes lindantes no se encontró en los genomas de Planctomycetes. Dado que no encontramos información sobre genes *alkB* para este filo en la bibliografía, realizamos una búsqueda mediante el sitio IMG/M dentro de los genomas de Planctomycetes disponibles (33 genomas anotados bajo el filo Planctomycetes). Utilizamos como filtro de búsqueda el número EC de la enzima, y también realizamos una búsqueda mediante blastp, utilizando como referencia la secuencia AlkB de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (CAL18155). En ningún caso obtuvimos resultados. Por lo tanto, los fósidos podrían derivar de un microorganismo del filo Planctomycetes aún no caracterizado.

En resumen, la gran diversidad microbiana encontrada en los sedimentos de Bahía Ushuaia (Capítulo 1, Resultados y Discusión), hace necesario el uso de técnicas independientes del cultivo de alto rendimiento para estudiarlos. Ambas técnicas utilizadas en este capítulo mostraron ser complementarias con respecto a la información obtenida, aportando información *de novo* sobre la diversidad de estos genes en el ambiente y sobre sus contextos genómicos. Aún teniendo en cuenta los posibles desvíos asociados a los eventos de transferencia horizontal de los

genes *alkB*, y los desvíos asociados a la falta de información en las bases de datos, nuestros resultados sugieren que los microorganismos del filo Bacteroidetes (en particular de la clase Flavobacteriia) y Planctomycetes podrían tener un rol tan importante como los microorganismos del filo Proteobacteria típicamente asociados a la biodegradación de alcanos en ambientes costeros fríos, la cual podría haber sido subestimada. Además, la identificación de secuencias AlkB novedosas en fragmentos genómicos relacionados con miembros no cultivados del filo Planctomycetes añade una nueva característica potencial para este grupo filogenético diverso y poco estudiado.



---

## CONCLUSIONES

---

## 5 CONCLUSIONES

El objetivo general de esta Tesis fue incrementar nuestro conocimiento sobre las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos alifáticos que habitan ecosistemas marinos crónicamente contaminados de ambientes subantárticos. Para ello se eligió Bahía Ushuaia como sitio de estudio, la cual presenta sitios puntuales de contaminación crónica con hidrocarburos provenientes de combustibles refinados. Los niveles de hidrocarburos alifáticos totales determinados para sedimentos intermareales de dos sitios cercanos en Bahía Ushuaia (muestreados durante el período 2006-2008) corresponden a una contaminación baja-moderada de acuerdo a los niveles encontrados en otros estudios a lo largo de la costa Patagónica (Commendatore, Nievas et al. 2012), y corresponden al rango observado para sedimentos portuarios de áreas urbanas o industriales (United Nations Environment Programme 1992). Estos mismos sedimentos presentaron sin embargo concentraciones relativamente altas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Marcos, Lozada et al. 2012) probablemente debido a la acumulación que estos sufren en la matriz del sedimento y su menor biodegradabilidad. Índices diagnósticos calculados a partir de los perfiles de hidrocarburos alifáticos de estos sitios demostraron que los mismos tienen origen petrogénico y están afectados por procesos de biodegradación, lo cual sugiere la presencia de comunidades microbianas adaptadas a la presencia de estos contaminantes.

Durante el trabajo correspondiente a esta Tesis se utilizaron dos herramientas moleculares independientes del cultivo de microorganismos, basadas en el análisis de marcadores funcionales (bibliotecas de productos de amplificación de alcano monooxigenasas *alkB*), y filogenéticos (secuenciación en gran escala de amplicones del gen para el ARNr 16S). A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que los sedimentos de zonas costeras urbanas de Bahía Ushuaia presentan una gran diversidad de variantes de genes *alkB*, con una predominancia de secuencias relacionadas al filo Proteobacteria, y Actinobacteria en segundo lugar. La mayoría de las variantes *alkB* observadas resultaron más similares a genes descritos en microorganismos no cultivados de zonas frías (sedimentos marinos o suelos), resaltando el rol de la temperatura en la estructuración de estas comunidades. Además de la temperatura, los aportes pequeños pero constantes de hidrocarburos refinados también estarían influenciando las comunidades autóctonas, ya que en al analizar una muestra representativa de sedimentos crónicamente contaminados (Planta Orión) por secuenciación en gran escala de amplicones del gen para el ARN ribosomal 16S se observó una comunidad dominada por géneros bacterianos conocidos por su capacidad de degradar hidrocarburos o que se han visto asociadas a la biodegradación a bajas

temperaturas: *Oleispira*, *Pseudoalteromonas*, *Glaciecola*, y *Psychrobacter* (Deppe, Richnow et al. 2005; Harwati, Kasai et al. 2007; Prabakaran, Manorama et al. 2007; Brakstad, Nonstad et al. 2008; Golyshin, Ferrer et al. 2010). Entre ellas, *Oleispira* se especializa en la biodegradación de alcanos, y pertenece al grupo de las bacterias hidrocarbonoclásticas obligadas (OHCB), de reconocida importancia global en la remoción de hidrocarburos en ambientes marinos contaminados (Yakimov, Timmis et al. 2007). Asimismo, miembros del clado Roseobacter (Alphaproteobacteria), y del género *Nocardioides* (Actinobacteria) también fueron abundantes.

La respuesta de una comunidad microbiana frente a un evento de contaminación con petróleo depende de numerosos factores, entre ellos, la composición del petróleo y el grado de intemperización, así como también de las condiciones ambientales, en particular la temperatura y la concentración de nutrientes (McGenity, Folwell et al. 2012). En el segundo capítulo de resultados de esta Tesis, evaluamos la respuesta de la comunidad bacteriana de una muestra de sedimentos de Planta Orión frente a una exposición experimental a petróleo crudo con y sin el agregado de nutrientes. Se utilizó una temperatura de 15 °C (semejante a la temperatura de la ciudad de Ushuaia en verano) y se evaluó el efecto luego de 20 días de exposición. La comunidad bacteriana del sedimento respondió rápidamente, observándose cambios tanto a nivel funcional como estructural. A nivel funcional, se observaron cambios rápidos en el perfil de hidrocarburos por cromatografía, y se identificaron secuencias de genes *alkB* que pueden ser consideradas relevantes ecológicamente por su distribución a lo largo de diferentes sitios y años en el sedimento, y su selección en los sistemas experimentales. Esta información puede ser utilizada en futuras aplicaciones, por ejemplo, para el desarrollo de herramientas moleculares de diagnóstico ambiental. En los últimos años ha cobrado mayor importancia el uso y la adaptación de herramientas moleculares (por ejemplo, PCR, qPCR, microarreglos, medidas de actividad enzimática) con el fin de obtener información valiosa sobre la presencia y actividad de microorganismos relacionados con la degradación, la cual no puede obtenerse por los métodos tradicionales. Así, la información proporcionada por las herramientas moleculares puede utilizarse en todas las etapas durante el manejo ambiental de un sitio (caracterización, remediación, monitoreo, y finalización) (ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council) 2011). Las herramientas moleculares han mostrado ser determinantes para la comprensión de los procesos ecológicos y de biodegradación que ocurren como consecuencia de un derrame, por ejemplo en el caso de los estudios de monitoreo realizados a partir del accidente del Golfo de México (Kimes, Callaghan et al. 2013). Dada su complejidad, el ambiente costero en especial los sedimentos, constituyen un desafío importante para la remediación ambiental, y en donde estas herramientas llegarán a cumplir un rol preponderante en los próximos años.

A nivel estructural, nuestros resultados indicaron que los grupos bacterianos que podrían estar involucrados en el proceso de atenuación natural de hidrocarburos corresponderían principalmente a las clases Alphaproteobacteria y Actinobacteria. Entre las Alphaproteobacteria, los miembros del clado Roseobacter y del género *Maribius*, los cuales se han reportado en otros estudios como asociados a la biodegradación de hidrocarburos alifáticos (Hara, Syutsubo et al. 2003; Harwati, Kasai et al. 2007; McKew, Coulon et al. 2007; Jiménez, Viñas et al. 2011) se sugieren como importantes para la biodegradación de estos compuestos en este sitio. Entre las Actinobacterias, los miembros del género *Nocardioides*, el cual posee cepas con la capacidad para degradar alcanos (Hamamura and Arp 2000), también se sugieren como relevantes para la biodegradación de estos compuestos en este ambiente. A pesar de ser de los microorganismos más abundantes en el sedimento, *Oleispira* no fue seleccionada en los sistemas experimentales. La temperatura de la muestra del sedimento original fue de 6,8 °C por lo cual probablemente la cepa correspondiente que habita en estos ambientes subantárticos sea la psicrófila, cuya temperatura óptima de crecimiento es 2 a 4 °C (Yakimov, Giuliano et al. 2003), bien menor a la temperatura de los experimentos.

Observamos que luego del tratamiento con petróleo crudo y nutrientes, se produce un cambio drástico en la estructura de la comunidad bacteriana, seleccionándose predominantemente los géneros *Alcanivorax* (Gammaproteobacteria) y *Thalassospira* (Alphaproteobacteria). *Alcanivorax*, también miembro del grupo de bacterias hidrocarbonoclasticas obligadas (OHCB) (Yakimov, Timmis et al. 2007), constituye el paradigma de la biodegradación de alcanos en el ambiente marino. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios donde se observó que *Alcanivorax* es un colonizador temprano y dominante en experimentos de exposición a hidrocarburos con el agregado de nutrientes (bioestimulación) (S. and M. 2010). Las bacterias del género *Thalassospira*, ampliamente distribuidas en el ambiente marino (Lai, Liu et al. 2014) y originalmente reconocidas por su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Kodama, Stiknowati et al. 2008; Zhao, Wang et al. 2010), podrían estar interaccionando en forma de consorcio con *Alcanivorax*. McKew y colaboradores sugirieron una interacción cooperativa entre *Alcanivorax* y microorganismos degradadores de HAPs en microcosmos de agua de mar y petróleo crudo, y lo atribuyeron a la capacidad de producción de biosurfactantes por parte de *Alcanivorax* (McKew, Coulon et al. 2007). Los biosurfactantes estarían mejorando la accesibilidad de los HAPs, beneficiando a las bacterias degradadoras de estos compuestos. Asimismo, *Alcanivorax* podría beneficiarse de esta situación al disminuir la concentración de componentes inductores de estrés como los HAPs. En base a estas observaciones, sugerimos que en nuestro sistema experimental

*Alcanivorax* y *Thalassospira* podrían estar participando cooperativamente de la biodegradación del petróleo crudo, siendo *Thalassospira* la responsable de la biodegradación de la fracción de hidrocarburos aromáticos, y *Alcanivorax* la responsable de la fracción de hidrocarburos alifáticos. No obstante, se necesitan futuros estudios para confirmar esta hipótesis, involucrando múltiples aspectos de la interacción y como ésta afecta la biodegradación (Olivera, Nievas et al. 2009).

Asimismo, no podemos descartar el posible aporte de otros grupos bacterianos que también fueron enriquecidos en los sistemas experimentales, para los cuales falta información sobre sus capacidades degradativas, y que por lo tanto fueron reportados por primera vez como asociados a la biodegradación de hidrocarburos. Tal es el caso de *Brevundimonas*, *Hellea*, *Hirschia*, *Gaetbulibacter*, *Gillisia*, y *Sediminibacter*. Es necesario dilucidar el posible rol de estos grupos en la biodegradación en este ambiente, así como también las vías de degradación utilizadas. Para ello, se están planificando estudios metagenómicos a partir de algunos de estos enriquecimientos, los cuales permitirán el ensamblado de genomas de interés de organismos aun no cultivados, inclusive algunos que en este trabajo no llegaron a ser clasificados a nivel de género por ser evolutivamente divergentes con respecto a las secuencias disponibles en las base de datos. Esto se llevará a cabo mediante una estrategia de “*binning*” o clasificación de las secuencias de las poblaciones de interés en base a diferencias en sus abundancias relativas entre los sedimentos originales y los enriquecimiento (Albertsen, Hugenholtz et al. 2013).

En el último capítulo, utilizamos dos enfoques metagenómicos para seguir ampliando nuestro conocimiento de la biodegradación de hidrocarburos alifáticos en sedimentos subantárticos. Una de estas estrategias, la secuenciación al azar y en gran escala del metagenoma, presenta la gran ventaja de lograr independizarse de los desvíos relacionados con la utilización de cebadores (Jurelevicius, Alvarez et al. 2013), y por lo tanto puede proporcionar información *de novo* sobre genes y microorganismos previamente inaccesibles por otras técnicas (Eisen 2007). Gracias a esta estrategia, se determinó de que en los sedimentos existe una importante proporción de genes *alkB* similares a los descritos en las Flavobacterias (filo Bacteroidetes). Además, una fracción de las secuencias AlkB identificadas *in silico* se encontraron relacionadas con genes *alkB* recientemente reportados en genomas de miembros del clado *Roseobacter* (familia Rhodobacteraceae). Anteriormente, habíamos sugerido que los miembros del clado *Roseobacter* serían importantes para la biodegradación de hidrocarburos alifáticos en el ambiente analizado (Capítulos 1 y 2), por lo que en conjunto nuestros resultados sugieren que una de las vías utilizadas por este grupo podría involucrar la activación de alcanos mediada por alcano monooxigenasas de la familia AlkB.

La gran proporción y diversidad de las secuencias identificadas *in silico* relacionadas con genes *alkB* reportados en miembros del filo Bacteroidetes contrasta con lo observado mediante el análisis de las bibliotecas de productos de amplificación, donde las variantes relacionadas con el filo Bacteroidetes fueron minoritarias (Capítulo 1). Esa diferencia probablemente se deba a la especificidad de los cebadores utilizados, que presentaron un desvío hacia secuencias de los filos Proteobacteria y Actinobacteria disponibles al momento del diseño de los mismos (Capítulos 1 y 2). Más aún, los miembros del filo Bacteroidetes, en especial de la clase Flavobacteriia (*Flavobacterium*, *Gaetbulibacter*, *Gillisia*, y *Sediminibacter*), también fueron enriquecidos luego de la exposición experimental a petróleo crudo y nutrientes (expOR08-ON, Capítulo 2). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la importancia de miembros del filo Bacteroidetes para el potencial de biodegradación de hidrocarburos en ambientes costeros de zonas frías podría haber sido subestimada, y que podrían tener un rol igual o mayor a los microorganismos del filo Proteobacteria. Recientemente un trabajo publicado por Nie y colaboradores (Nie, Chi et al. 2014) demostró la amplia diversidad de secuencias AlkB que existen al momento en genomas secuenciados de miembros de este filo, y en metagenomas de diferentes ambientes, lo cual está en concordancia con nuestros resultados.

Debido a la complejidad de las comunidades microbianas naturales y la corta longitud de las lecturas provenientes de las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, en muchos casos el proceso de ensamblado de las lecturas es altamente ineficiente (Wooley and Ye 2009). De hecho, en el set de datos correspondiente al metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia, el porcentaje de secuencias ensambladas fue bajo. El uso de otra estrategia metagenómica complementaria, tal como el clonado de insertos grandes del metagenoma en fósmidos, puede ser útil en la recuperación de secuencias de genes de longitud completa y al análisis de su contexto genómico, con la ventaja adicional de que las enzimas correspondientes se encuentran disponibles para futuros estudios bioquímicos o aplicaciones biotecnológicas (Kim, Kim et al. 2007). En nuestro caso, la construcción de una biblioteca metagenómica en fósmidos a partir de una de las muestras de sedimentos de Bahía Ushuaia (OR07) dio como resultado la obtención de 46.000 clones, abarcando aproximadamente 1,8 Gb de información genética de este ambiente. Mediante la búsqueda por PCR en esta biblioteca, se identificaron dos fragmentos genómicos (de longitud 33 kb y 38 kb), conteniendo secuencias AlkB de longitud completa y novedosas, como así también genes contiguos potencialmente involucrados en el metabolismo de alcanos y lípidos. Ambos fragmentos genómicos se encontraron relacionados con los genomas de miembros del filo Planctomycetes, y uno de ellos pudo ser asignado al género *Rhodopirellula*, gracias a la presencia de una secuencia parcial del gen ARNr 23S. Las bacterias del filo

Planctomycetes fueron uno de los grupos abundantes en este sitio según el análisis secuenciación en gran escala de amplicones del gen ARNr 16S (2,6%, Capítulo 1), si bien no fueron seleccionadas en los sistemas experimentales de exposición a hidrocarburos (Capítulo 2). No existían hasta el momento reportes de la presencia de genes que codifican para la degradación de alcanos en este grupo filogenético, a pesar de cumplir un rol preponderante en el ciclado del carbono en el ambiente marino, se encuentra aún muy poco estudiado (Wagner and Horn ; Woebken, Teeling et al.).

Es de destacar que se utilizaron los mismos cebadores tanto para la amplificación de genes *alkB* a partir de los sedimentos (Capítulo 1), como en el *screening* de la biblioteca metagenómica (Capítulo 3), y sin embargo, recuperamos genes *alkB* diferentes en ambas situaciones. Esto podría deberse a que se utilizaron diferentes extracciones de ADN en cada situación. Por ejemplo, en suelos se observó que la diversidad bacteriana revelada puede variar dependiendo del método de extracción de ADN utilizado (İnceoğlu, Hoogwout et al. 2010). Para la construcción de las bibliotecas de productos de amplificación se utilizó un *kit* comercial (Materiales y métodos, sección 3.9), mientras que para la construcción de la biblioteca metagenómica se utilizó un método de extracción manual basado en (Zhou, Bruns et al. 1996) (Materiales y métodos, sección 3.11). Por otro lado, las bibliotecas de productos de amplificación fueron construidas en plásmidos (TOPO-TA Cloning®, Invitrogen), mientras que para la construcción de la biblioteca metagenómica se utilizaron fósmidos (CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit, Epicentre). Incluso diferentes sistemas de clonado basados en plásmidos (como los sistemas TOPO TA y pGem-T) presentan preferencias en la ligación de insertos (Palatinszky, Nikolausz et al. 2011).

Los resultados obtenidos resultaron ser complementarios en cuanto a la información obtenida, por lo que podemos concluir que con cada técnica estamos “observando” a la comunidad desde una perspectiva particular, cada una con sus ventajas y limitaciones, pero que en conjunto nos permiten obtener una visión más completa, al ir sorteando los desvíos correspondientes a cada una. Según cuál sea el objetivo de estudio, algunas estrategias resultarán más o menos acordes (Forney, Zhou et al. 2004; Ghai, Martin-Cuadrado et al. 2010).

En resumen, el estudio mediante métodos independientes del cultivo de las comunidades microbianas de un ambiente frío crónicamente contaminado de la Patagonia, nos permitió la identificación de genes biomarcadores y microorganismos indicadores para la biodegradación de alcanos en estos ambientes, inferir su posible respuesta a la exposición a petróleo crudo y su comportamiento frente a la bioestimulación con nutrientes, así como también avanzar en el

análisis del contexto genómico de algunos de estos genes en grupos microbianos ecológicamente relevantes pero aún poco conocidos.



## 6 APÉNDICE

**Figura A1. Secuencias AlkB obtenidas de la base de datos de secuenciación al azar del metagenoma**

>30087095271\_ARG05

HEMGHKRGKLPQLLAKLTLIPVCYGHFLVEHNRGHHVRVATPEDPASAKLGESFWQFLPRTVIGGILSAWQ  
LEKKKLQRKQL

>11034441\_ARG02

GINVAHELGHRTKRYERIMGKLLLLPSLYMHFYIEHNYGHHVHAATKEDPATAKYNQSVYSFWVTSVARQ  
YINAWVLQRKLLRSENRGVFSL

>13566711\_ARG03

HELGHRTKRYERIMGKLLLLPSLYMHFYIEHNYGHHVHAATKEDPATAKYNQSVYSFWVTSVARQYINAW  
VLQRKLLRSENRGVF

>10149501\_ARG03

MKRLKYIFVFTLPIVVYLSFNSQGVMTFGPVVYAFLIIPAIELFLKPKRNLQVTLRKEKDARVYDWILYVA  
VFVQLLMVISFLFVIDLTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRSSRMEQFLGELLLLTSLNTHFLPY  
HNEGHHREVATPKDAATAKKDQWLYSFWFTSHFRSYVKAWKIENNMKMRDGSILSLSNRMVVYSIANV  
LVIGLIYYFFDLKVLFAFVL

>11128001\_ARG05

MSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRSSRMEQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPSDAATA  
KKDQWLYSFWITSHFKSYVKAWKIENNMRRNGKSIFSLSNKMIVYSIANLAVLSTIYFLDLKVFLAFILAA  
VIGILLGTVDYIEHYGLLRKLNASG

>10620741\_ARG06

LHELATSSYETFELVGIISMGIIVLTNGINVAHELGHRTKRYERIMGKLLLLPSLYMHFYIEHNYGHHVHAA  
TKEDPATAKYNQSVYSFWVTSVARQYINAWVLQRKLLRSEN

>30801490191\_ARG02

VLYAMVPVLYGLLVFFLFSISEVGLTNLEIVGRVLSLGVITVTIGINVGHELGHRTTKHEQFMSKALLTTTLQL  
HFIIEHNRGHHK

>30625140471\_ARG05

YLHVPIMYCILLVFLFGVRDGHYGSLELLGLTFSVGILGAMGMNLGHELGHRRGWFNQLCANLFWLPNLY  
MHFGIEHNS

>30073388671\_ARG02

KNKLFDWLLYLNLPPVFGLLFFALKVITNQALETYEIIGFVFSIGIVLAINGINVAHELGHRQSTNERFLGKAL  
LLPSFYMHF

>3433052281\_ARG06

FTKEAAENRTVNTIFDWLLYLNPVIVFGVLIWALLEVSLSPLETYEFVGVLTIGMMFSVNGINVAHELGHR  
QTTNERFLGKLLLLPS

>11320661\_ARG02

NLNENEHEVKKHKNIFDWLLYLNPVVYGLLFYAIWVSTHSISTIEIIGLSLSVGIVLTNGINVAHELGHRI  
KTKERYLGKIL

>30459035471\_ARG02

ATNFEGKEREARKLKNKLFDWLLYLNIPLVFLFYFSLHELATSSYETFELVGIISMGIIVLTNGINVAHELGH  
RTKRYE

>10273413\_ARG05

MKDLKYLAFTIPISAFIGIYFKGYWSFITPVYAFLIPALELLLPVNATNFEGKEREARKLKNKLFDWLLYLNI  
PLVFGFLFYFSLHELATSSYETFELVGIHSMGIVLGTNGINVAHELGHRTKRYERIMGKLLLPSPLYMHFYIEH  
NYGHHV

>30693799951\_ARG05

YLNPLVFSIAIYGLSVSSNTLQTYEFVGLIFSVGIVLGVNGINVAHELGHRTTNERFLGKALLPSPFYMHF  
YIEHNFGHHLNAAT

>11039171\_ARG02

DSYNFDKETAQLEKENKLYNWILYVTVPIQISMLFFFFYVIQESLTTTEYIGRISAMGLMCGVLGINVGHEL  
HRMNKAEVLLGELMLLTS

>10060261\_ARG03

MKRLKYLLVYLLPISVYISFTSEGIITLFPVILFFGIVPILEVFFKADSYNFDKETAQLEKENKLYNWILYVTVPI  
QISMLFFFFYVIQESLTTTEYIGRISAMGLMCGVLGINVGHELGHHRMDKAEVLLGELMLLT

>10588651\_ARG01

ADSYNFDKETAQLEKENKLYNWILYVTVPIQISMLFFFFYVIQESLTTTEYIGRISAMGLMCGVLGINVGHEL  
GHHRMDKAEVLLGELMLLTSLNTHFLPYHNGGH

>30623914181\_ARG05

TKEEEKKVKNKSFYDWIYINVPAQFTLLFFFLWKITSTDLATFELIGKTISMGVACGVLGINVAHELGHHRHK  
KYEQWMSK

>30311946991\_ARG05

LELMTRPDPRNLSEAESLRRVDRVYDYLLYLMVPMQWGFVIWFLFAISQPGLSWVTLAGRITGMGLMCG  
AFGINVAHEL

>30790433561\_ARG05

NLSKTEKELAKEDSIYDFIHLVLPVHLYVIYYFLTITIGDPLLTSDLVARIIMMGVALAFLGINMGHELGHKT  
NNAFKQI

>30221446951\_ARG05

YYFLITISDPGLTNSDIARVFMGTLLGVFGINIGHELGHKTNSLWKQFFAQVLLTSMQNHFIYPYHNGGHH  
RDIGTPADL

>30350274911\_ARG05

MLISFFVIDLTPLNSISFYGKSFAMGLMCGVIGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEG  
HREVATPDAA

>30877795541\_ARG02

LVSSQSLSNTEIIGLTFSLGIVLGTNGINVAHELGHRLKTKERYLGKLLLPSPLYMHFYIEHNFGHHVNAATN  
EDPATAKY

>3098459131\_ARG06

IDLTPLNSISFYGKSFAMGLMCGVIGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPD  
DAATARK

>10355941\_ARG02

MKRLKYIFVFTLPIVVYLSFNSQGVMTFGPVVYAFLIIPAIELFLKPKRNLQVTLRKEKDARVYDWILYVA  
VFVQLMVISFLFVIDLTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRS

>30898217101\_ARG02

KRNLDPSLQKEKNSKVYDWILYLAVPIQLMLISFLYVIELTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGH  
RSSRMEQFLG

>10820641\_ARG01

DHLLPTDASNPPEEVVPQLEADSYRVLTYLTVPIHYFTLIYTAYIVGTQNLPHAVLGLALSVGVVNGLAI  
NTGHELGHKKTRLERWLAKI

>12627171\_ARG03

TDASNPPEEVVPQLEADSYRVLTYLTVPIHYFTLIYTAYIVGTQNLPHAVLGLALSVGVVNGLAINTGHE  
LGHHKKTRLERWLAKIALAVV

>14115521\_ARG05

YDWILYLSLPVQVLMISFLFVIDLTPLDSISFYGKTFMGLMCGVMGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLT  
SLNTHFLPYHNEGHHREV

>30074876911\_ARG05

LNEKSKVYDWILYLSLPQFLMLISFFFVIDLTPLNSISFYGKTFAMGLMCGVIGINIGHELGHRSKRWQQFL  
GEILLTSLNTHFLPY

>12452191\_ARG05

LLPTDASNPPEEVVPQLEADSYRVLTYLTVPIHYFTLIYTAYIVGTQNLPHAVLGLALSVGVVNGLAINTG  
HELGHKKTRLERWLAKIALAVVGYGHFLIEHNRGHHVDVATP

>30530482301\_ARG05

VWVPVQFVMLFGLIWYVSPAHLNTLEKLAIFFGVGVINGTIGINYSHELMHQKNRLERWLADALLAMVLY  
SHFRSEHLLVHHR

>30788412271\_ARG05

VPLHFLILLCGAWFVARHDPGWSGLLALSITVGAISGFAINTGHELGHKKGRDLRLAARLVLAAPCYGHFSI  
EHNAGHHAE

>3212381241\_ARG06

VPIHYFTLIYTAYVVGTQNLPPYAVLGLALSVGVVNGLAINTGHELGHKKTKLERWLAKIVLAVVGYGHFLI  
EHNRGHHVD

>30033411541\_ARG05

ENNPPEEHSQLELDPYRRLTFIAVPLYFISFLGAAAYAATQDLSAAAYACLAIIAGLTAGLAINSAHELGHK  
NSKPEKL

>30866285361\_ARG02

NPPEEIVPQLEEDHYRRLTWVTVPLHFITLIAVAWFAASQDLSTWSLLLLAITAGAYSGLGVNTHAHELGHK  
KTALEQYLAKF

>30264154561\_ARG05

AGGLETTFEMVGMTWSIGIIVSTIGINVAHELGHRVKKSEQLMSKSLLLSALYMHFFIEHNKGHHKNIATDED  
PASSRLNENLYAFWVRST

>30866622931\_ARG05

LGINTAHELGHKKTPPEQLLAKIALMIPAYGHFCVEHNNHGHRYVATPGDPASARMGESIYRFALREIPGAF  
RRGWQVES

>30022778261\_ARG05

GVSSDVMGLSAAHELAHRINGKFEPILSKILYGTVLYIHFGMEHVVGHHKRVATPEDPATLRLGESFYAYLP  
RSVFGGFNSVWEFE

>30052934601\_ARG05

GKIILFFGVGIASGTIGINYSHELMHRPGKLQRWLGDLLLASVLYSHFRSEHLLVHHTYVGTTPRDAVTARYN  
EGFQRFFPRV

>30124124041\_ARG02

THELVGMIISVGIVLGVNGINVAHELGHQRHTNERLIGKALLPSQYMHFYIEHNFGHHLHAATPEDPATAR  
YNQSVYSFWFT

>30800902951\_ARG02

VGLIFSVGIVLGVNGINVGHELGHQRATNERFIGKALLPSLYMHFYIEHNFGHHLHAATKEDPATARYNQ  
VYSFWFTS

>13043121\_ARG03

SSQSVSNTETIIGLTFSLGIVLGTNGINVAHELGHRLKNKERYLGKLLLLPSLYMHFYIEHNFGHHVNAATHED  
PATAKYNQTVYSFWIT

>3375783141\_ARG06

IVLGTNGINVAHELGHRLTTNERHLGKLMLLPSFYMHFYIEHNFGHHLNAATKEDPATAQYNQTVYSFWF  
TSVILQYFGAWK

>30035489461\_ARG02

MGLMCGVMGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPND SATARKGELLFVF  
WIRSHFSSYAKA

>11027971\_ARG02

AMGLMCGVIGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPADAATARKGELLFVF  
WIRSHFSSYAKAWQIENRRM

>30023893731\_ARG05

NSISFYGKTFAMGLMCGVIGINIGHELGHRSKRWQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPDDAATA  
RKGELLFVFWIRS

>30332449271\_ARG05

GVLGINIGHELGHRSRKEQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPKDAATAKKGQWLYSFRITSHFK  
SYAKAWKIENNK

>30424736561\_ARG05

IGHELGHRSRMEQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPDDAATAKKDQWLYSFWISSHFKSYAKA  
WKIENNRMQ

>11088001\_ARG06

TPXMSVSFIGKVFSMGLLCGVGINIGHELGHRSRMEQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPSDAA  
TAKKDQWLYSFWITSHFKSY

>3161369221\_ARG06

MCGVTGINIGHELGHRSRLEQLLGEMLLSSLNTHFLPYHNEGHHREVATPGDPATAKINQWLFSFWLSS  
HFGSYVKAWKIENNRM

>10305721\_ARG02

LPYHNEGHHREVATPSDAATAKKDQWLYSFWITSHFKSYVKAWKIENNRMRNGKSIFSLSNKMIVYSIA  
NLAVLSTIYFLFDLKVFLAFILAAVIGILLGTVDYIEHYGLLRKLNASGRYERVQHRHSWNSDHQLGR

>30390068201\_ARG05

HKRGKLPQLLAKLTLPVCYGHFLVEHNRGHHVRVATPEDPASAKLGESFWQFLPRTVIGGILSAWKLEKK  
KLQRKQLPTWHWSNE

>30077850281\_ARG05

FSQLLMTVGYMHFFIEHNRGHHVKVATPTDPATSRQGESFYFFWVRSVFKGYMSAWSLEKARLTKKKIK  
VLSIHNQMIWFSLLPFLFWISI

>30238085351\_ARG05

MHQKPKWERWLGDILLASVLYAHFRSEHLLVHHRYVATPKDPVTARYNEGFHKFFVRVLKGSLLSAFNAE  
RAMLARKGKRW

>12152321\_ARG05

EILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPADAATARKGELLFVFWIRSHFSSYAKAWQIENRRMKKTGKSIFSI  
SNRMIFYTLANIVLLLSIYYFFNIKVLFAFVLAAVVGILLETVNYIEHY

>30526802821\_ARG05

LLTSLNTHFLPYHNGGHHFNVATPNDAAATARKNEPLYIFWFRSHFSSYREAWQLENKRMKEVGKPLVSLQ  
NKMIQYSIANALLL

>3206250991\_ARG06

EMLLLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPNDPATAMRNQWLIHFVWSSHFGSYIKAWSVEKARMQKQGNP  
YSFKNRMVVYS

>3176884471\_ARG06

GHHREVATPSDAATAKKGQSLFTFWITSHFGSYFKAWKIENNRMKRLGKSIFSLSNRMFIYSIANVVLVAGI  
YFFFGFKVL

>3176557221\_ARG06

QSKYLFTLGEFVYVSLFGHHTSAHRLVHHRFVATTHDPNSARLGQTAYRFLPRAWIGSFRAGLKAETQRR  
LGVKSKGTHP

>3038897761\_ARG06

RLAQVPGFFTYFSIRHPYGHNLVATPADPATAQRGDNFYFSFSTRSIIGQYKMTWDLEKERLDKMDFETW  
TWRNEALRGWAME

>3327289801\_ARG06

TSLEMHFMPYHNNGHHNVATPNDLATARKGELVFTFWFRSQIGSYFQAWNLEIKRLKKKGKSPFSFRNK  
ALSYTLIQIASIAG

>3192183561\_ARG06

WQQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPADAATARKGELLFVFWIRSHFSSYAKAWQIENRRMKK  
TGKSIFSISNRMIFYT

>10961231\_ARG05

VDVATPIDPASAKMGQSIYAFASWEIPGAVRRRAWASEKTRLAKSGRGPWTLDNEVLQPTLMTVILYGGLLV  
AFGWIMVPYLFIQAMWGWFGILTSSNYIEHYGLLRQKLENGRYERCQPHHSWNSNHMSNLILFNLQRHS  
DHHANATRRYQCLRNFFENLPQLPSGYPLMYVIAMIPPLWFAIMDPV

>30721946881\_ARG02

IRKKLTSGRYERVKEVHSWNSNHVVGRIVLYELTRHSDHHYKSSKKYQILDYHDSSPQMPYGYPTSMVMSF  
LPPLWFKVMNPRIPAEMKS

>30008606141\_ARG05

CQPHHSWNANYTFSNIVLFHLERHSDHHANPSRRYQSLRNFDDIPDLPNGYFGTYLIAVYPWLWYKVMKD  
RLLALPHINGDLG

>30799369881\_ARG05

RKKLADGTYEKVTIRHSWNAPHRFTNYILFKLQRHSDHHENAMKPYQTLLSLKESPQLPHGYSLCIAMALN  
PPMWFKVMDP

>30136803701\_ARG05

RCQPHHSWNANYTFSNIVLFHLERHSDHHANPSRRYQSLRNFADIPELPNGYFGTYLIAYVPWLWYRVMD  
KRLALPHINGDLS

>30009702521\_ARG05

HIYSNLVLFQLQRHSDHHAHPLRRYQSLRHFEHLPSLPNGYFGAYLLAYVPWLWFRVMDKRLGLLEHIQG  
DLTKINIDPKRDSIHRKY

>3002966991\_ARG06

SWNSNHVLRLLLLFEISRHSDDHYRPARPYQVLRHMEGSPQMPTGYPGMIVLSLFPPLWFAVMHPHIRKF  
KEQNEAAMAPA\*

>3448442581\_ARG06

TFSNIVLFQLERHSDHHANSSRRYQSLRNFDDIPQLPNGYFGTYLIAYIPWLWYRVMDKRLALPHVNGDL  
SKLNIDPEK

>30677061131\_ARG05

ILMLETVNIEHYGLLRHKNESGRYERVKHWHWSNSDHQIGRLMLFNLSRHSDDHYKASKKYQVLESLPE  
SPQMPTGYPGMMLA

>10419571\_ARG01

VGILLLETVNIEHYGLLRKNSSGRYERNRTHSWNSDHQIGRLMLFNLSRHSDDHFKSSKKYQVLESLEE  
SPQMPTGYPGMMLALIQLWFALMNNKLENNKPPAPN\*

>30122705731\_ARG05

HYGLLRKKLPSPGRYERVKVHWSNSNHVVGRIVLYELTRHSDHHYKSSKKYQILDYHDISPQMPYGYPTSM  
VMSFLPPLWFKVMN

>3008495401\_ARG06

NYIEHYGLIRKKLPSPGRYERVREVHWSNSNHVMGRILYELTRHSDHHYKSSKKYQILDYHDSSPQMPFGYP  
TSMVLSFLPPL

>30035755651\_ARG02

VVLESINYIEHYGLRRDKTKNGRYERVAEHSWNSNHVLGRIMLYELTRHSDHHYKSHKKYQLLDCHETS  
PQMPYGYPTSLVLAL

>3388026141\_ARG06

VQSVVAFITLLELINYLEHYGLERRKLANGRYETVKQYHSWNSGHVMTNLNLINLGRHSDHHYKASRPYHIL  
RYVSDAPQLPYGYST

>30728552211\_ARG05

SIFGVILLETVNIEHYGLLRKSPNGNYERVGPKHSWNSDHILARWMLFELSRHSDHHSASKEYQILDSY  
DDSPQMPTGY

>3280524341\_ARG06

VEHYGLLRKREKTAKGRYERCEPHHSWNCNFVVSNNLLFHLERHSDHHAHPLRRYQSLRHFPDLPQLPNGYF  
GMYVLAYLPWLWFK

>3204647961\_ARG06

YIEHYGLLRKREKTAKGRYERCEPHHSWNCNFIVSNLVLFHLERHSDHHAHPLRRYQSLRHFPDLPQLPNGYF  
GMYVIAYPW

>30609978961\_ARG02

LTSANYIEHYGLLREKTEDGRYERCQPHHSWNANYTFSNIVLFHLERHSDHHANPSRRYQSLRNFADIPEL  
PNGYFGTYL

>30830537111\_ARG05

EGMLNFTLIAVLGILLGSVDYIEHYGLQRKKLDNGKYERVKHTHSWNSNHVLGRLLLFNLSRHSDHHFKA  
HKKYQVLDSV

>3200477071\_ARG06

GWIMIPFLAIHNVWAWFQLTSANYIEHYGLLREMHADGRFERCKPHHSWNANYIFSNIALFQLERHSDHH  
ANSSRRYQSLRN

>30420011451\_ARG02

ASYLIAILLFFGKIGLFFALLSALTGFLLLETVNYIEHYGLLRLKTESGRYERVKEIHSWNSNHVVGRIVLYELT  
RHSDDHYS

>3289894751\_ARG06

IAILLFFGKIGLFFALLSALTGFLLLETVNYIEHYGLLRLKTESGRYERVKEIHSWNSNHVVGRIVLYELTRHS  
DHHYKSS

>3445693031\_ARG06

IVFLLFGKTALFFAILAAITAFLLLETVNYIEHYGLLRLKKTSGRYERVKEIHSWNSNHVIGRILLYELTRHSD  
HHYRTSKKYQ

>10468551\_ARG06

NIVLLLSIYYFFNIKVLFAFVLAADVVGILLLETVNYIEHYGLLREKNSSGRYERVNRTHSWNSDHQIGRLMLF  
NLSRHSDHHFKSSKKYQVLESLEESPQMPTGYPGMMMLALIQLWFAIMNKKLE

>30536696131\_ARG05

LIYYLFDKVLFAFILAIIIGILLGTVDYIEHYGLLRKINKSGRYERVKHHHSWNSDHQIGRLMLFNLSRHSD  
HHYKSSRKYQLLES

>30775495381\_ARG02

SIYLIFGLKVLFSFLIVASIGILLLETVNYIEHYGLLRKLNENGRYEVKVRHYHSWNSDHIIGRCMLFNLSRHSD  
HHYNGSKKYQLLS

>3200602051\_ARG06

YLFFNIETMVAFLSASILGILMLETVNYIEHYGLLREIKKNGKYERVQPYHSWNSDHVGRSILFELSRHSDH  
HYKASKHYQLLDSF

>10340241\_ARG03

LVAFGWIMVPYLFIQAMWGWFGILTSSNYIEHYGLLRQKLENGRYERCQPHHSWNSNHIMSNLILFNLQR  
HSDHHANATRRYQCLRNLFENLPQLPSGYPLMYVIAMIPPLWFAIMDPRVAAWADGDISKLNVLPSSEERL  
ALRYGLRQGLRQAA\*

>30680221271\_ARG05

TVILVAHLGWMIAPFILVHHIFGWYGLTQANYVEHYGLLRQKHENGRYETCQPHHSWNTNHIFSNIAMTFH  
LQRHSDHHANPMRP

>30265308381\_ARG05

YAGSLVLQGGLIYAFGWIMIPFLAIHNVWAWYQLTSANYIEHYGLLREVDKEGRFERCQPHHSWNANYTFS  
NIVLFHLERHSDHHANS

>3421361961\_ARG06

ERHSDHHANSSRRYQSLRNFDDIPQLPNGYFGTYLIAYIPWLWYRVMDKRLALPHVNGDLSKLNIDPEKR  
DLIYAKYGKG

>11008751\_ARG01

FRQYFNAWRIQLDLLRRQGLSFINVKNMLWYVLFQLGYLISVLILFGNKGFGFMLLSGIVGFLLLESVNYIE  
HYGLRLKTDG

>10842921\_ARG02

RRAWASEKTRLAKSGRGPWTLDNEVLQPTLMTVILYGGLLVAFGWIMVPYLFIQAMWGWFGILTSSNYIE  
HYGLLRQKLENGRYERCQPHHSWNSNH

>30675080831\_ARG02

RNSKPAWHWSNAWLQYQLLQVLFLITIVLVFGLTPLYFVASAVFGILLETINYVEHYGLQRNKNNSGVYE  
GLKLQHSSNSDHPL

>11758251\_ARG03

HHFNVATPKDAATARKNEALYFFWVRSHFASYLNAWQLENKRLNENKNVISFHNKMIRYSIANLLVLGT  
IFYFFGLIVILSFIAAAVIGILQLETVNYIEHYG

>30749378381\_ARG05

RGKSTWSVHNNILQSYIGSLVLQGGMLIAFGWIMLPFLAVHNVWAWYQLTSANYIEHYGLLREKNDNGRY  
ERCQPHHSWNANYTF

>30096184501\_ARG05

FEAWALEKDRLARRGKSIWSTNNQILHSFAISALLAFTLVATFGWIVIPFIVLHHFAFWWQLTSANYVEHY  
GLLRQKDASGK

>30288584771\_ARG05

GKSIFSQNKALIYTLIQLIFIASIYYFYGGKTCLLFIAAATFGILLETVNYIEHYGLLRKKNEKGRYERVMHYH  
SWNSDHPLGR

>30520481881\_ARG05

WNLENEKLKKQGASFFSLKNEMLLFQIIQIAYLVSVGLYFGWFVVPFAIIIAITGFLLLETVNYIEHYGLRRKK  
LPSSGRYENV

>30643337971\_ARG05

LKRNNRSFFSKNDMLWYFIFSCLYLIFLLYFFGTTVLLAIATGLIGTILLETINYIEHYGLSRIKKKSGRYER  
VTDIHSW

>3232851481\_ARG06

EKTRLERRGDPVWSLNNHNDVLQSYAITLVLHTAVVIAFGWIMLPFLLIHNFLAWWQLTSANYIEHYGLLRA  
KKENGKYENC

>3205719791\_ARG06

NARLQKRGLPSASLRNPYWQYCLGALATIALTYSLGFKGVIAVLVLSFYAQSQMLIIDYVQHYGLQRKKMG  
NGKYEPVSP

>30560485871\_ARG02

LIIQLAYLLGILLIFGQTGLLFALGAALVGFLLETVNYIEHYGLLRKKLPSSGRYERVKEVHSWNSNHVVGRIV  
LYELTRH

>3163078571\_ARG06

DMFWCLVIEAFYLFATFFFFGQVGFLFSLASAVVGFTLLETVNYIEHYGLRLKSKSGRYERVKEIHSWNSN  
HVIGRIVLYELT



>3348037891\_ARG06

ALSYTLIQIASIAGIYFLYGGVLATLFVAAAVFGILLLETVNIEHYGLLRNKNEQGRYERVRHHHSWNSDHV  
LGRAMLFELSRHS

>3437816171\_ARG06

TAIQYALLFAIYFIFGLTSLLMFVGAAGIGILLLETVNIEHYGMLRKKNDGGRYERVRNYHSWNSDHPLGR  
TMLFELSRHSD

>3389576421\_ARG06

TIANILVIGLIYYLFDKVLFAFVLAIIIGISLLGTVDYIEHYGLLRKLNASGRYERVQHKHSWNSDHQLGRML  
LFNLSRHSD

>30408730051\_ARG05

LVIQIGFVVGVALLFSPATMVCFLLAAGMGIFLLETVNIVEHYGLMRSEISPGKYERTMPHHHSWNSDHILGR  
LMLFELSRHS

>3440710891\_ARG06

NDILQSYAISAVLQLGLIAVFGWIMIPFLAIHNFVAWYQLTSANYIEHYGLLREKQANGRYERTQPHHSWN  
ANYIFSNIALFHL

>10004523\_ARG01\_longitud completa

LTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRSSRMEQFLGEILLTSLNTHFLPYHNEGHHREVATPSDA  
ATAKQDQWLYSFWITSHFKSYVKAWKIENNRMRNGKSIFSLSNKMIVYSIANLAVLSTIYFLFDLKVFLAFI  
LAAVIGILLGTVDYIEHYGLLRKLNASGRYERVQHRHSWNSDHQLGRMLFNLSRHSDHXYKASKKYQLL  
ESLPESPQMPTGYPGMMMLATIPPLFFWIMNKKIKS\*

>10041471\_ARG01\_longitud completa

MKRLKYIFVFTLPIVVYLSFNSQGVMTFGPVVYAFLIIPAIELFLKPKRNLQDLTLRKEKDARVYDWILYVA  
VVFQLLMVISFLFVIDLTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRSSRMEQFLGELLLTSLNTHFLPY  
HNEGHHREVATPKDAATAKQDQWLYSFWITSHFRSYVKAWKIENNMKRDGKSILSLSNRMVVYSIANV  
LVIGLIYYFFDLKVLFAFVLAIIIGISLLGTVDYIEHYGLLRKINESGRYERVKHHHSWNSDHQIGRLMLFNLS  
RHSDHXYKASKKYQLLESQPESQPLPTGYPGMMMLATIPPLFFM

>10080042\_ARG05\_longitud completa

MKDLKYLAFTIPISAFIGIYFKGYWSFITPVYAFLIPALELLLPVNATNFEGKEREARLKNKLFDWLLYLNI  
PLVFGFLFYFSLHELATSSYETFELVGIIISMGIVLGTNGINVAHELGHRTKRYERIMGKLLLPSPLYMHFYIEH  
NYGHHVHAATKEDPATAKYNQSVYSFWVTSVARQYINAWVLQRKLLRSENRGVFSLYNDMLWYTLIQFV  
HLSLIYYFFGASVLLYALLAALVGFLLETVNIEHYGLIRKKLPSPGRYERVREHHSWNSNHVMGRILYELT  
RHSDHXYKSSKKYQILDYHDSSPQMPFGYPTSMVLSFLPPLWFKIMNPRIPDEMKTSGL\*

>10078282\_ARG03\_longitud completa

MKRLKYLFVFILPLGVYFSFNRHGLSTFGPVIWAFFFIPLIELFLRPDKRNLQDSLQKEKNSKVYDWILYLA  
VPIQLMLISFLFVIELTPFMSVSFIGKVFSMGLLCGVLGINIGHELGHRSSRMEQFLGEILLTSLNTHFLPYH  
NEGHHREVATPSDAATAKQDQWLYSFWITSHFKSYVKAWKIENNRMRNGKSIFSLSNKMIVYSIANLAV  
LSTIYFLFDLKVFLAFILAAVIGILLGTVDYIEHYGLLRKLNASGRYERVQHRHSWNSDHQLGRMLFNLSR  
HSDHXYKASKKYQLLESPLPESQMPPTGYPGMMMLATIPPLFFWIMNKKIKS\*

**Tabla A1. Información de los genes predichos en los fragmentos genómicos correspondientes a los fósidos #401 y 964.** La longitud se expresa en pares de base para las secuencias codificantes para ARN, y en aminoácidos para las secuencias codificantes para proteínas. Las funciones predichas corresponden a los resultados obtenidos con las plataformas bioinformáticas ISGA y RAST, a excepción del ORF 36 (obtenido mediante búsqueda con el algoritmo blastn), y de los CDS 0 y 64 (predicciones hecha con el software en línea FGENESB). Con un recuadro se indican los operones predichos por el software en línea FGENESB.

| Posición           | Hebra | Longitud | Gen predicho              | Denominación | Función predicha  |
|--------------------|-------|----------|---------------------------|--------------|---|
| <b>Fósido #401</b> |       |          |                           |              |   |
| 1..976             | -     | 976 pb   | <i>ARNr 23S (parcial)</i> | ORF 36       | ARNr 23S  |
| 1750..1825         | -     | 76 pb    | <i>ARNt-Ala</i>           | ORF 37       | ARNt-Ala  |
| 1906..1979         | -     | 74 pb    | <i>ARNt-Ile</i>           | ORF 38       | ARNt-Ile  |
| 2317..4233         | +     | 638      |                           | CDS 39       | Probable tioredoxina  |
| 4386..6044         | +     | 552      |                           | CDS 40       | Proteína de la familia acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, plasmática/isoforma intracelular II (ISGA); Hidrolasa de éster carboxílico (RAST) |
| 6718..7338         | +     | 206      |                           | CDS 42       | Proteína hipotética   |
| 7390..8328         | +     | 312      |                           | CDS 43       | Endo-1,4-beta-xilanasas B putativa  |
| 8415..10220        | -     | 601      | <i>fadD2</i>              | CDS 44       | Ácido graso de cadena larga-CoA ligasa EC 6.2.1.3   |
| 10527..11591       | +     | 354      | <i>alkB1</i>              | CDS 46       | Alcano 1-monooxigenasa 1 EC 1.14.15.3   |
| 11623..12237       | +     | 204      |                           | CDS 47       | Regulador transcripcional, familia TetR   |
| 12438..13661       | +     | 407      |                           | CDS 48       | Proteína hipotética   |
| 13835..15337       | +     | 500      |                           | CDS 49       | Proteína hipotética   |
| 15340..16635       | +     | 431      | <i>lysA</i>               | CDS 50       | Diaminopimelato decarboxilasa EC 4.1.1.20   |
| 16765..17964       | -     | 399      |                           | CDS 51       | Peptidasa S45, proteína con dominio penicilina amidasa  |
| 18042..18932       | +     | 296      | <i>sqdC</i>               | CDS 52       | UDP-glucosa 4-epimerasa EC 5.1.3.2  |
| 18948..21035       | -     | 695      |                           | CDS 53       | Xantano liasa putativa  |

Tabla A1 (continuación)

| Posición            | Hebra | Longitud | Gen predicho | Denominación    | Función predicha   |
|---------------------|-------|----------|--------------|-----------------|--|
| 21588..23069        | -     | 493      | <i>gnd</i>   | CDS 56          | 6-phosphogluconato deshidrogenasa EC 1.1.1.44  |
| 23438..24817        | +     | 459      |              | CDS 57          | Proteína hipotética transmembrana  |
| 25023..25772        | +     | 249      | <i>ate</i>   | CDS 58          | ARNt-Arginina transferasa EC 2.3.2.8   |
| 25960..27507        | +     | 515      |              | CDS 59          | Proteína hipotética-predicción de región transmembrana y péptido señal   |
| 27658..28389        | +     | 243      |              | CDS 60          | Proteína hipotética  |
| 28398..30428        | +     | 676      |              | CDS 61          | Dominio SPFH / proteína de la familia Band 7 (ISGA); Proteína de la membrana externa YqiK (RAST)               |
| 30451..30909        | -     | 152      |              | CDS 62          | Transposasa putativa   |
| 31145..33896        | +     | 917      |              | CDS 64          | ATPasa probable (parcial)  |
| <b>Fósmido #964</b> |       |          |              |                 |  |
| 1..808              | -     | 269      |              | CDS 0 (parcial) | Proteína de la familia fosfotransferasa  |
| 826..2346           | -     | 506      | <i>alh</i>   | CDS 2           | Proteína de la familia aldehído deshidrogenasa EC 1.2.1.3 (ISGA); Aldehído deshidrogenasa B EC 1.2.1.22 (RAST) |
| 2389..3300          | -     | 303      |              | CDS 3           | Proteína hipotética FIG008480  |
| 3366..4436          | -     | 356      | <i>alkB</i>  | CDS 4           | Alcano -1 monooxigenasa  |
| 4708..5166          | +     | 152      | <i>rpiB</i>  | CDS 5           | Ribosa 5-fosfato isomerasa B EC 5.3.1.6  |
| 5182..7002          | -     | 606      |              | CDS 6           | Proteína de división celular FTsI; Peptidoglicano sintetasa EC 2.4.1.1.129                                     |
| 7009..7353          | -     | 114      |              | CDS 7           | Proteína hipotética  |
| 7458..9242          | -     | 594      |              | CDS 8           | Proteína con dominio lysM (ISGA), Proteína básica rica en prolina (RAST)                                       |
| 9287..10177         | -     | 296      | <i>mraW</i>  | CDS 9           | S-adenosil-metiltransferasa MraW (ISGA); Metiltransferasa H subunidad pequeña ARNr (RAST)                      |

| Tabla A1 (continuación) |   |     |              |        |   |
|-------------------------|---|-----|--------------|--------|---|
| 10396..10605            | - | 69  |              | CDS 10 | Proteína no caracterizada   |
| 11323..13824            | + | 833 | <i>pepN</i>  | CDS 11 | Aminopeptidase dependiente de Zn  |
| 13828..14544            | + | 238 |              | CDS 12 | Proteína hipotética   |
| 14891..15361            | + | 156 |              | CDS 14 | Glioxalasa EC 4.4.1.5 / Resistencia a bleomicina / Proteína de la superfamilia dioxigenasa (ISGA)<br>Proteína PhnB; Proteína con dominio de unión a ADN 3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferasa (RAST) |
| 15405..16886            | - | 493 | <i>gatA</i>  | CDS 15 | ARNt-Glutamil (Gln) amidotransferasa subunidad A  |
| 16994..17287            | - | 97  | <i>gatC</i>  | CDS 16 | ARNt-Glutamil (Gln) y/o ARNt-aspartil (Asn) amidotransferasa, subunidad C   |
| 17751..19562            | + | 603 | <i>typA</i>  | CDS 17 | Proteína de unión a GTP TypA/BipA   |
| 19919..21508            | - | 529 | <i>acrA1</i> | CDS 18 | Epimerasa dependiente de NAD / proteína de la familia deshidratasa (ISGA)<br>Probable proteína acrA1 (RAST)   |
| 22107..22820            | - | 237 |              | CDS 19 | Proteína hipotética   |
| 23408..25435            | - | 675 |              | CDS 21 | Proteína hipotética   |
| 26030..27244            | + | 404 |              | CDS 22 | Proteína de la familia 3'-5' exonucleasa (ISGA)<br>Ribonuclease D EC 3.1.26.3 (RAST)  |
| 27449..29044            | - | 531 |              | CDS 24 | Proteína de la familia de oxidoreductasas dependientes de FAD (ISGA)<br>Deshidrogenasa NAD (FAD), sll0175 homólogo (RAST)   |
| 29430..31139            | + | 569 |              | CDS 26 | Proteína quinasa serina/treonina  |
| 31517..32956            | - | 479 |              | CDS 27 | Proteína de la familia repetición rica en leucina (ISGA)<br>Proteína de la familia Rab (RAST)   |
| 33436..33714            | - | 92  |              | CDS 29 | Proteína de membrana putativa   |

|              |   |     |                               |   |
|--------------|---|-----|-------------------------------|---|
| 33907..34488 | - | 193 | CDS 30                        | Factor sigma de la ARN polimerasa, familia sigma-70                       |
| 36171..37043 | - | 290 | CDS 34                        | Fosfolipasa/Familia Carboxilesterasa (ISGA); Lipoproteína putativa (RAST) |
| 37137..37505 | - | 122 | CDS 35                        | Proteína no caracterizada   |
| 37766..38323 | - | 185 | <i>albXV</i> CDS 36 (parcial) | Carbamoiltransferasa  |

**Tabla A2. Clasificación taxonómica de los genes predichos en los fragmentos genómicos correspondientes a los fósidos #401 y 964.** Para identificar la secuencia más cercana en la base de datos del NCBI, se utilizaron los algoritmos blastn y blastp para las secuencias codificantes para ARN y para las secuencias codificantes para proteínas, respectivamente.

| Gen                | %Identidad/similitud secuencia más cercana en la base de datos del NCBI   | Clasificación MEGAN               |
|--------------------|---|-----------------------------------|
| <b>Fósido #401</b> |   |                                   |
| ORF 36             | 92% <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1 (BX294148)   | <i>Pirellula staleyi</i> DSM 6068 |
| ORF 37             | 93% <i>Microvirgula aerodenitrificans</i> (AF148123)  | No asignado                       |
| ORF 38             | 99% <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1 (BX294148)   | No asignado                       |
| CDS 39             | 60/75% Tiorredoxina <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI16728)   | Género <i>Rhodopirellula</i>      |
| CDS 40             | 35/53% Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, plasmática/isoforma intracelular II <i>Hirschia baltica</i> ATCC 49814 (ACT60233) | Filo Proteobacteria               |
| CDS 42             | 46/67% Proteína hipotética RSSM_05636 <i>Rhodopirellula sallentina</i> SM41 (EMI52909)  | <i>Rhodopirellula</i> sp. SWK7    |
| CDS 43             | 36/48% Beta-xilanas <i>Bacteroides dorei</i> (WP_007838253)   | Bacteria                          |
| CDS 44             | 58/74% Ácido graso de cadena larga-CoA ligasa <i>Cupriavidus</i> sp. BIS7 (WP_019451156)  | Bacteria                          |
| CDS 46             | 55/75% Proteína hipotética <i>Flexithrix dorotheae</i> (WP_020526648)   | Filo Bacteroidetes                |
| CDS 47             | 31/52% Proteína hipotética <i>Sporichthya polymorpha</i> (WP_019873923.1)   | No asignado                       |

**Tabla A2 (continuación)**

| Gen    | %Identidad/similitud secuencia más cercana en la base de datos del NCBI  | Clasificación MEGAN                |
|--------|--|------------------------------------|
| CDS 48 | 36/52% Proteína hipotética conservada Nhal_2195 <i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4 (ADE15287) nota="proteína relacionada a alfa-L-glutamato ligasa;TIGR02291" | Filo Proteobacteria                |
| CDS 49 | 35/49% Proteína hipotética H261_15882 <i>Magnetospirillum</i> sp. SO-1 (EME68938)  | Filo Proteobacteria                |
| CDS 50 | 52/66% Proteína hipotética SCE1572_41195 <i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2 (AGP40361)   | Clase Deltaproteobacteria          |
| CDS 51 | 47/59% Peptidasa S45, penicilina amidasa <i>Congregibacter litoralis</i> KT71 (EAQ95987)   | Gammaproteobacteria sin clasificar |
| CDS 52 | 74/85% Epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI19169)   | Familia Planctomycetaceae          |
| CDS 53 | 65/80% Proteína probablemente secretada-xantano liasa putativa <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL60405)   | Bacteria                           |
| CDS 56 | 89/94% 6-fosfogluconato deshidrogenasa <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI19002)   | Familia Planctomycetaceae          |
| CDS 57 | 67/81% Proteína secretada conteniendo DUF1598 <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI19417) pfam07643  | Género <i>Rhodopirellula</i>       |
| CDS 58 | 66/79% ARNt Arginina-proteína transferasa <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI19415)  | Género <i>Rhodopirellula</i>       |
| CDS 59 | 56/71% Proteína conteniendo DUF1598, parcial <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI21618)   | Género <i>Rhodopirellula</i>       |
| CDS 60 | 60/77% Proteína de membrana putativa, parcial <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI17498)  | Género <i>Rhodopirellula</i>       |
| CDS 61 | 81/89% Proteína Band 7 <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI17559)   | Género <i>Rhodopirellula</i>       |
| CDS 62 | 47/64% Transposasa Flavobacteriaceae bacterium S85 (WP_010135828)  | Bacteria                           |
| CDS 64 | 81/91% ATPasa, tipo AAA+ <i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1 (EMI17557)   | Género <i>Rhodopirellula</i>       |

**Tabla A2 (continuación)**

| Gen                 | %Identidad/similitud secuencia más cercana en la base de datos del NCBI                                   | Clasificación MEGAN       |
|---------------------|---|---------------------------|
| <b>Fósmido #964</b> |   |                           |
| CDS 0<br>(parcial)  | 38/58% Aminotransferasa putative clase III <i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535 = NBRC 104270 (BAM00394) | Bacteria                  |
| CDS 2               | 70/81% Aldehído deshidrogenasa B bacteria no cultivada A1Q1_fos_1246 (AGC72838)                           | Bacteria                  |
| CDS 3               | 66/82% Proteína hipotética Lbys_3139 <i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132 (ADQ18800)                | Bacteria                  |
| CDS 4               | 51/70% Proteína hipotética <i>Nafulsella turpanensis</i> (WP_017732889)                                   | Bacteria                  |
| CDS 5               | 68/83% Ribosa 5-fosfato isomerasa B <i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645 (EAQ79069)                     | Bacteria                  |
| CDS 6               | 50/67% Proteína de unión a penicilina <i>Schlesneria paludicola</i> (WP_010587468)                        | Familia Planctomycetaceae |
| CDS 7               | 37/65% Proteína hipotética PM8797T_01489 <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL56815)                    | No asignado               |
| CDS 8               | 41/59% Proteína de union a peptidoglicano LysM <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL56816)              | Familia Planctomycetaceae |
| CDS 9               | 53/69% S-adenosil-metiltransferasa MraW <i>Schlesneria paludicola</i> DSM 18645 (ZP_11095440)             | Familia Planctomycetaceae |
| CDS 10              | 56/82% Proteína hipotética Psta_3131 <i>Pirellula staleyi</i> DSM 6068 (ADB17795)                         | No asignado               |
| CDS 11              | 59/76% Aminopeptidasa putativa <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL61579)                              | Bacteria                  |
| CDS 12              | 32/49% Proteína hipotética Cabther_B0800 Candidatus Chloracidobacterium thermophilum B (AEP13797)         | No asignado               |
| CDS 14              | 56/72% Glioxalasa <i>Hahella chejuensis</i> (WP_011398549)  | Organismos celulares      |
| CDS 15              | 63/77% Asp-ARNtAsn/Glu-ARNtGln amidotransferasa subunidad A <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL60004) | Bacteria                  |

|                  |   |                               |
|------------------|---|-------------------------------|
| CDS 16           | 51/75% glutamil-ARNt(Gln) amidotransferasa, subunidadC <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL60003)        | <i>Planctomyces maris</i>     |
| CDS 17           | 72/85% Proteína de unión a GTP TypA <i>Schlesneria paludicola</i> (WP_010587296)                            | Familia Planctomycetaceae     |
| CDS 18           | 49/65% Proteína con dominio esterilidad masculina <i>Pirellula staleyi</i> DSM 6068 (ADB19283)              | Familia Planctomycetaceae     |
| CDS 19           | 41/55% Proteína exportada <i>Rhodopirellula europaea</i> 6C (EMB15957)                                      | <i>Rhodopirellula baltica</i> |
| CDS 21           | -   | No asignado                   |
| CDS 22           | 52/70% Ribonucleasa D <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL60640)   | Familia Planctomycetaceae     |
| CDS 24           | 66/80% Proteína hipotética PM8797T_10054 <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL61055)                      | Familia Planctomycetaceae     |
| CDS 26           | 39/57% Proteína kinasa probable yloP-Serina/treonina proteína kinasa <i>Planctomyces maris</i> (EDL61639)   | Familia Planctomycetaceae     |
| CDS 27           | -   | Organismos celulares          |
| CDS 29           | 66/84% Proteína hipotética PM8797T_15596 <i>Planctomyces maris</i> DSM 8797 (EDL58035)                      | Bacteria                      |
| CDS 30           | 34/52% ECF subfamilia factor sigma-24 ARN polimerasa <i>Schlesneria paludicola</i> DSM 18645 (WP_010581792) | No asignado                   |
| CDS 34           | 42/54% poli(3-hidroxibutirato) depolimerasa <i>Singulisphaera acidiphila</i> DSM 18658 (AGA26545)           | Bacteria                      |
| CDS 35           | 62/72% Proteína hipotética <i>Nonomuraea coxensis</i> (WP_020543620)  | <i>Nonomuraea coxensis</i>    |
| CDS 36 (parcial) | 56/72% Proteína hipotética <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (WP_018271425)                                     | Bacteria                      |



**Tabla A3. Información de los genes predichos en los fragmentos genómicos identificados *in silico* en el set de datos de secuenciación al azar del metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia.**

| Posición                               | Hebra | Longitud (aa) | Denominación (IMG/M)            | Función predicha                    |
|--|-------|---------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| <b>TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_c1000452</b> |       |               |                                 |                                     |
| 3..680                                 | -     | 226           | TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_10004521 | Nitrilasa EC:3.5.5.1                |
| 869..3253                              | +     | 795           | TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_10004522 | Canal iónico COG3264                |
| 3280..4041                             | -     | 254           | TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_10004523 | Alcano 1-monooxigenasa EC:1.14.15.3 |
| <b>TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_c1004147</b> |       |               |                                 |                                     |
| 2..1003                                | -     | 334           | TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_10041471 | Alcano 1-monooxigenasa EC:1.14.15.3 |
| 1010..1237                             | -     | 76            | TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_10041472 | Proteína hipotética                 |
| <b>TDF_OR_ARG03_113mDRAFT_c1007828</b> |       |               |                                 |                                     |
| 3..278                                 | +     | 92            | TDF_OR_ARG04_113mDRAFT_10078281 | Proteína hipotética                 |
| 292..1320                              | +     | 343           | TDF_OR_ARG04_113mDRAFT_10078282 | Alcano 1-monooxigenasa EC:1.14.15.3 |
| <b>TDF_OR_ARG05_123mDRAFT_1008004</b>  |       |               |                                 |                                     |
| 3..1502                                | -     | 500           | TDF_OR_ARG05_123mDRAFT_10080041 | Proteína hipotética                 |
| 1576..2625                             | +     | 350           | TDF_OR_ARG05_123mDRAFT_10080042 | Alcano 1-monooxigenasa EC:1.14.15.3 |
| 2679..2822                             | +     | 48            | TDF_OR_ARG05_123mDRAFT_10080043 | Glutamil-tRNA sintetasa EC:6.1.1.17 |

**Tabla A4. Clasificación taxonómica de los genes predichos en los fragmentos genómicos identificados *in silico* en el set de datos de secuenciación al azar del metagenoma de sedimentos de Bahía Ushuaia.** Los nombres de los genes se encuentran abreviados para mayor claridad.

| Gen                                    | %Identidad/similitud secuencia más cercana en la base de datos del NCBI                       | Clasificación MEGAN       |
|--|---|---------------------------|
| <b>TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_c1000452</b> |   |                           |
| 10004521                               | 77/89% Hidrolasa de carbono-nitrógeno <i>Flavobacteriia bacterium</i> no cultivada (CCG00677) | Organismos celulares      |
| 10004522                               | 29/49% Canal iónico <i>Formosa agariphila</i> KMM 3901 (CDF78255)                             | Dominio Bacteria          |
| 10004523                               | 66/84% Desaturase de ácidos grasos <i>Aquimarina agarilytica</i> (WP_010178519)               | Familia Flavobacteriaceae |
| <b>TDF_MC_ARG01_113mDRAFT_c1004147</b> |   |                           |
| 10041471                               | 63/79% Desaturase de ácidos grasos <i>Aquimarina agarilytica</i> (WP_010178519)               | Familia Flavobacteriaceae |
| 10041472                               | 71/82% Glicosil hidrolasa <i>Dokdonia</i> sp. 4H-3-7-5 (WP_013750532)                         | Orden Flavobacteriales    |
| <b>TDF_OR_ARG03_113mDRAFT_c1007828</b> |   |                           |
| 10078281                               | 73/85% Glicosil hidrolasa <i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i> (WP_010518797)            | Clase Flavobacteriia      |
| 10078282                               | 61/80% Desaturase de ácidos grasos <i>Aquimarina agarilytica</i> (WP_010178519)               | Familia Flavobacteriaceae |
| <b>TDF_OR_ARG05_123mDRAFT_1008004</b>  |   |                           |
| 10080041                               | 74/88% Proteína hipotética <i>Eudoraea adriática</i> (WP_019670873)                           | <i>Eudoraea adriatica</i> |
| 10080042                               | 82/91% Proteína hipotética <i>Eudoraea adriática</i> (WP_019670872)                           | Orden Flavobacteriales    |
| 10080043                               | 98/100% Proteína hipotética <i>Eudoraea adriática</i> (WP_019670871)                          | Filo Bacteroidetes        |

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abed, R. M. M. (2009). Nucleic Acid-Based Techniques for Studying Diversity and Activity of Bacterial Communities in Oil-Contaminated Sediments. Contaminated Sediments. T. A. Kassim and D. Barceló, Springer Berlin Heidelberg: 97-160.
- Al-Tahhan, R. A., T. R. Sandrin, et al. (2000). "Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates." Appl Environ Microbiol **66**(8): 3262-8.
- Al Khudary, R., N. I. Stosser, et al. (2008). "Pseudoalteromonas arctica sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 9): 2018-24.
- Alain, K., B. J. Tindall, et al. (2008). "Hellea balneolensis gen. nov., sp. nov., a prosthecate alphaproteobacterium from the Mediterranean Sea." Int J Syst Evol Microbiol **58**(Pt 11): 2511-9.
- Albertsen, M., P. Hugenholtz, et al. (2013). "Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes." Nat Biotech **31**(6): 533-538.
- Alonso-Gutiérrez, J., A. Figueras, et al. (2009). "Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the *Prestige* oil spill." Appl Environ Microbiol **75**(11): 3407-3418.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**(17): 3389-3402.
- Amann, R., W. Ludwig, et al. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol Rev **59**(1): 143-169.
- Amin, O., L. Comoglio, et al. (2010). "Assessment of land influence on a high-latitude marine coastal system: Tierra del Fuego, southernmost Argentina." Environmental Monitoring and Assessment **175**(1-4): 63-73.
- Atlas, R. M. and T. C. Hazen (2011). "Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History." Environmental Science & Technology **45**(16): 6709-6715.
- Avigan, J. and M. Blumer (1968). "On the origin of pristane in marine organisms." J Lipid Res **9**(3): 350-2.
- Aziz, R. K., D. Bartels, et al. (2008). "The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology." BMC Genomics **9**(75): 1471-2164.
- Baker, G. C., J. J. Smith, et al. (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers." J Microbiol Methods **55**(3): 541-55.
- Baraniecki, C. A., J. Aislabie, et al. (2002). "Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium Isolated from Antarctic Soil." Microbial Ecology **43**(1): 44-54.
- Béjà, O., L. Aravind, et al. (2000). "Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea." Science **289**(5486): 1902-1906.
- Bell, T. H., E. Yergeau, et al. (2011). "Identification of nitrogen-incorporating bacteria in petroleum-contaminated arctic soils using [<sup>15</sup>N]DNA-based stable isotope probing and pyrosequencing." Appl Environ Microbiol **12**: 4163-4171.
- Bihari, Z., A. Pettko-Szandtner, et al. (2007). "Isolation and characterization of a novel n-alkane-degrading strain, *Acinetobacter haemolyticus* AR-46." Z Naturforsch C **62**(3-4): 285-95.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, et al. (1997). "The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.
- Boll, M. and J. Heider (2010). Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of C-H-Bond Activation in the Absence of Oxygen. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1011-1024.

- Bozal, N., E. Tudela, et al. (1997). "Pseudoalteromonas antarctica sp. nov., Isolated from an Antarctic Coastal Environment." International Journal of Systematic Bacteriology **47**(2): 345-351.
- Brakstad, O., I. Nonstad, et al. (2008). "Responses of Microbial Communities in Arctic Sea Ice After Contamination by Crude Petroleum Oil." Microbial Ecology **55**(3): 540-552.
- Brakstad, O. G. (2008). "Natural and stimulated biodegradation of petroleum in cold marine environments." Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology: 389-407.
- Brakstad, O. G. and A. G. Lodeng (2005). "Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea." Microb Ecol **49**(1): 94-103.
- Bray, J. R. and C. T. Curtis (1957). "An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin." Ecol Monogr **27**: 325-349.
- Brinkhoff, T., H. A. Giebel, et al. (2008). "Diversity, ecology, and genomics of the Roseobacter clade: a short overview." Arch Microbiol **189**(6): 531-9.
- Broadway, N. M., F. M. Dickinson, et al. (1993). "The enzymology of dicarboxylic acid formation by *Corynebacterium* sp. strain 7E1C grown on n-alkanes." Journal of General Microbiology **139**(6): 1337-1344.
- Buchan, A. and J. M. González (2010). Roseobacter. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1335-1344.
- Buchan, A., J. M. Gonzalez, et al. (2005). "Overview of the marine roseobacter lineage." Appl Environ Microbiol **71**(10): 5665-77.
- Canosa, I., J. M. Sanchez-Romero, et al. (2000). "A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." Mol Microbiol **35**(4): 791-9.
- Canosa, I., L. Yuste, et al. (1999). "Role of the alternative sigma factor sigmaS in expression of the AlkS regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." J Bacteriol **181**(6): 1748-54.
- Caporaso, J. G., J. Kuczynski, et al. (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." Nat Methods **7**(5): 335-6.
- Cappelletti, M., S. Fedi, et al. (2011). "Analyses of both the alkB gene transcriptional start site and alkB promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on n-alkanes." Appl Environ Microbiol **77**(5): 1619-27.
- Carver, T. J., K. M. Rutherford, et al. (2005). "ACT: the Artemis Comparison Tool." Bioinformatics **21**(16): 3422-3.
- Commendatore M, Esteves JL, et al. ( 2008). Niveles y origen de hidrocarburos en sedimentos de la Bahía de Ushuaia (Tierra del Fuego). II Congreso SETAC, Mar del Plata, Argentina.
- Commendatore, M. G. and J. L. Esteves (2004). "Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina)." Mar Pollut Bull **48**: 910-918.
- Commendatore, M. G. and J. L. Esteves (2007). "An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina." Environ Manage **40**(5): 814-821.
- Commendatore, M. G., J. L. Esteves, et al. (2000). "Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina: levels and probable sources." Mar Pollut Bull **40**: 989-998.
- Commendatore, M. G., M. L. Nievas, et al. (2012). "Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina)." Mar Environ Res **74**: 20-31.
- Cottrell, M. T., J. A. Moore, et al. (1999). "Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms."
- Coulon, F., B. A. McKew, et al. (2007). "Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters." Environ Microbiol **9**(1): 177-186.
- Courtois, S., A. Frostegard, et al. (2001). "Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation." Environ Microbiol **3**(7): 431-9.
- Cravo-Laureau, C. and R. Duran (2014). "Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: contribution of experimental ecology in the omics'era." Front Microbiol **5**(39): eCollection 2014.
- Chang, Y. J., J. R. Stephen, et al. (2000). "Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method." J Microbiol Methods **40**(1): 19-31.

- Chao, A. (1984). "Nonparametric estimation of the number of classes in a population." Scandinavian Journal of Statistics **11**: 265-270.
- Chao, A., M.-C. Ma, et al. (1993). "Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates." Biometrika **80**(1): 193-201.
- Choi, D. H., J. C. Cho, et al. (2007). "Maribius salinus gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and Maribius pelagius sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the Roseobacter clade." Int J Syst Evol Microbiol **57**(Pt 2): 270-5.
- Daniel, R. (2004). "The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products." Current Opinion in Biotechnology **15**(3): 199-204.
- Daniel, R. (2005). "The metagenomics of soil." Nat Rev Microbiol **3**(6): 470-8.
- Das, N. and P. Chandran (2011). "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview." Biotechnology Research International **2011**.
- Decho, A. W. (2000). "Microbial biofilms in intertidal systems: an overview." Continental Shelf Research **20**(10-11): 1257-1273.
- Delmont, T. O., P. Robe, et al. (2011). "Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches." J Microbiol Methods **86**(3): 397-400.
- DeLong, E. F. (1992). "Archaea in coastal marine environments." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5685-9.
- DeLong, E. F., C. M. Preston, et al. (2006). "Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior." Science **311**(5760): 496-503.
- DeLong, E. F., K. Y. Wu, et al. (1994). "High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton." Nature **371**(6499): 695-7.
- Deppe, U., H.-H. Richnow, et al. (2005). "Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium." Extremophiles **9**(6): 461-470.
- Di Bella, J. M., Y. Bao, et al. (2013). "High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research." J Microbiol Methods **95**(3): 401-14.
- Diaz, S., C. Camilion, et al. (2006). "Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies." Photochem Photobiol **82**(4): 834-43.
- Dinamarca, M. A., I. Aranda-Olmedo, et al. (2003). "Expression of the Pseudomonas putida OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures." J Bacteriol **185**(16): 4772-8.
- Dionisi, H. M., M. Lozada, et al. (2011). Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted subantarctic marine sediments. Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. F. J. d. Bruijn. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.: 461-473.
- Dubbels, B. L., L. A. Sayavedra-Soto, et al. (2007). "Butane monooxygenase of 'Pseudomonas butanovora': purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase." Microbiology **153**(Pt 6): 1808-16.
- Dubbels, B. L., L. A. Sayavedra-Soto, et al. (2009). "Thauera butanivorans sp. nov., a C2-C9 alkane-oxidizing bacterium previously referred to as 'Pseudomonas butanovora'." Int J Syst Evol Microbiol **59**(Pt 7): 1576-8.
- Eastcott, L., W. Y. Shiu, et al. (1988). "Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: A review of data and development of simple correlations." Oil and Chemical Pollution **4**(3): 191-216.
- Edgar, R. C., B. J. Haas, et al. (2011). "UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection." Bioinformatics **27**(16): 2194-2200.
- Eggink, G., H. Engel, et al. (1988). "Alkane utilization in Pseudomonas oleovorans. Structure and function of the regulatory locus alkR." Journal of Biological Chemistry **263**(26): 13400-13405.
- Eisen, J. A. (2007). "Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes." PLoS Biol **5**(3): e82.
- Epicentre CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector.  
<http://www.epibio.com/>.
- Epstein, S. S. (2013). "The phenomenon of microbial uncultivability." Curr Opin Microbiol **16**(5): 636-42.

- Esteves, J. L. and O. Amín (2005). Evaluación de la contaminación urbana de las bahías de Ushuaia, Encerrada y Golondrina. Informe Técnico del Proyecto "Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la zona costera patagónica para la conservación de la biodiversidad". Proyecto GEF-PNUD ARG 02/G31 69.
- Esteves, J. L., O. Amín, et al. (2006). Evaluación preliminar de la contaminación en la zona costera de la provincia de Tierra del Fuego. Informe Técnico del Proyecto "Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la zona costera patagónica para la conservación de la biodiversidad". Proyecto GEF-PNUD ARG 02/G31: 34.
- Esteves, J. L., M. G. Commendatore, et al. (2006). "Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina." Mar Pollut Bull **52**(5): 582-590.
- Feng, L., W. Wang, et al. (2007). "Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5602-7.
- Fernandez-Gomez, B., M. Richter, et al. (2013). "Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach." Isme J **7**(5): 1026-37.
- Ferris, M. J., G. Muyzer, et al. (1996). "Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community." Applied and Environmental Microbiology **62**(2): 340-6.
- Formolo, M. (2010). The Microbial Production of Methane and Other Volatile Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **1**: 113-126.
- Forney, L. J., X. Zhou, et al. (2004). "Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king." Curr Opin Microbiol **7**(3): 210-20.
- Foro para la Conservación del Mar Patagónico y Áreas de Influencia (2008). Síntesis del estado de conservación del Mar Patagónico y áreas de influencia. Puerto Madryn, Argentina, Edición del Foro.
- Fujii, T., T. Narikawa, et al. (2004). "Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6." Biosci Biotechnol Biochem **68**(10): 2171-7.
- Funhoff, E. G., U. Bauer, et al. (2006). "CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation." J Bacteriol **188**(14): 5220-7.
- Gauthier, M. J., B. Lafay, et al. (1992). "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium." Int J Syst Bacteriol **42**(4): 568-76.
- Ghai, R., A. B. Martin-Cuadrado, et al. (2010). "Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing." Isme J **4**(9): 1154-66.
- Giebler, J., L. Y. Wick, et al. (2013). "Evaluating the Assignment of alkB Terminal Restriction Fragments and Sequence Types to Distinct Bacterial Taxa." Applied and Environmental Microbiology **79**(9): 3129-3132.
- Gil, M. N., A. I. Torres, et al. (2011). "Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina)." Mar Pollut Bull **6**(1): 201 - 207.
- Gilbert, J. A., D. Field, et al. (2010). "The taxonomic and functional diversity of microbes at a temperate coastal site: a 'multi-omic' study of seasonal and diel temporal variation." PLoS One **5**(11): e15545.
- Ginolhac, A. I., C. Jarrin, et al. (2004). "Phylogenetic Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil Metagenomic Libraries Allows Selection of Promising Clones." Applied and Environmental Microbiology **70**(9): 5522-5527.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, et al. (1990). "Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton." Nature **345**(6270): 60-3.
- Glockner, F. O., M. Kube, et al. (2003). "Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8298-303.
- Godzik, A. (2011). "Metagenomics and the protein universe." Curr Opin Struct Biol **21**(3): 398-403.

- Golyshin, P. N., T. N. Chernikova, et al. (2002). "*Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons." *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 3): 901-911.
- Golyshin, P. N., M. Ferrer, et al. (2010). Oleispira. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag **3**: 1755-1764.
- Golyshin, P. N., V. A. Martins Dos Santos, et al. (2003). "Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems." *J Biotechnol* **106**(2-3): 215-20.
- Gomez-Pereira, P. R., M. Schuler, et al. (2012). "Genomic content of uncultured Bacteroidetes from contrasting oceanic provinces in the North Atlantic Ocean." *Environ Microbiol* **14**(1): 52-66.
- Good, I. J. (1953). "The population frequencies of species and the estimation of population parameters." *Biometrika* **40**: 237-264.
- Greenwood, P. F., S. Wibrow, et al. (2009). "Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure." *Org Geochem* **40**(3): 293-300.
- Grimaud, R. (2010). Biofilm Development at Interfaces between Hydrophobic Organic Compounds and Water. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1491-1500.
- Grimaud, R., J. F. Ghiglione, et al. (2012). "Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds." *J Bacteriol* **194**(13): 3539-40.
- Grund, A., J. Shapiro, et al. (1975). "Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*." *Journal of Bacteriology* **123**(2): 546-556.
- Gutell, R. R., N. Larsen, et al. (1994). "Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective." *Microbiol Rev* **58**(1): 10-26.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hamamura, N. and D. J. Arp (2000). "Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8." *FEMS Microbiol Lett* **186**(1): 21-6.
- Hamamura, N., M. Fukui, et al. (2008). "Assessing soil microbial populations responding to crude-oil amendment at different temperatures using phylogenetic, functional gene (*alkB*) and physiological analyses." *Environ Sci Technol* **42**(20): 7580-7586.
- Hamamura, N., C. M. Yeager, et al. (2001). "Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8." *Appl Environ Microbiol* **67**(11): 4992-8.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* **166**(4): 557-580.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, et al. (1998). "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products." *Chem Biol* **5**(10): R245-9.
- Hara, A., S. H. Baik, et al. (2004). "Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2." *Environ Microbiol* **6**(3): 191-7.
- Hara, A., K. Syutsubo, et al. (2003). "*Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation." *Environ Microbiol* **5**(9): 746-53.
- Harayama, S., Y. Kasai, et al. (2004). "Microbial communities in oil-contaminated seawater." *Curr Opin Biotechnol* **15**(3): 205-14.
- Harms, H., K. E. C. Smith, et al. (2010). Introduction: Problems of Hydrophobicity/Bioavailability *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1439-1450.
- Harris, K. A., M. B. Yunker, et al. (2011). "Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters." *Environ Pollut* **159**(10): 2665-74.
- Harwati, T., Y. Kasai, et al. (2007). "Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater." *Microbes Environ.* **22**(4): 412-415.
- Head, I. M., D. M. Jones, et al. (2006). "Marine microorganisms make a meal of oil." *Nat Rev Microbiol* **4**(3): 173-82.

- Hedlund, B. P. and J. T. Staley (2006). "Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* strains with divergent polycyclic aromatic hydrocarbon catabolic properties." *Environ Microbiol* **8**(1): 178-82.
- Heiss-Blanquet, S., Y. Benoit, et al. (2005). "Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR." *Journal of Applied Microbiology* **99**(6): 1392-1403.
- Hemmerich, C., A. Buechlein, et al. (2010). "An Ergatis-based prokaryotic genome annotation web server." *Bioinformatics* **26**(8): 1122-1124.
- Herlemann, D. P. R., D. Lundin, et al. (2013). "Metagenomic De Novo Assembly of an Aquatic Representative of the Verrucomicrobial Class Spartobacteria." *mBio* **4**(3): e00569-12.
- Hernandez-Arranz, S., R. Moreno, et al. (2013). "The translational repressor Crc controls the *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation strategy." *Environ Microbiol* **15**(1): 227-41.
- Holmström, C. and S. Kjelleberg (1999). "Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents." *FEMS Microbiology Ecology* **30**(4): 285-293.
- Hong, H., D. R. Patel, et al. (2006). "The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel." *J Biol Chem* **281**(11): 7568-77.
- Huse, S. M., L. Dethlefsen, et al. (2008). "Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing." *PLoS Genet* **4**(11): e1000255.
- Huse, S. M., D. M. Welch, et al. (2010). "Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering." *Environ Microbiol* **12**(7): 1889-1898.
- Huson, D. H., A. F. Auch, et al. (2007). "MEGAN analysis of metagenomic data." *Genome Res* **17**(3): 377-86.
- Huson, D. H., S. Mitra, et al. (2011). "Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4." *Genome Research* **21**(9): 1552-1560.
- Huu, N. B., E. B. Denner, et al. (1999). "Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well." *Int J Syst Bacteriol* **2**: 367-75.
- İnceoğlu, Ö., E. F. Hoogwout, et al. (2010). "Effect of DNA Extraction Method on the Apparent Microbial Diversity of Soil." *Applied and Environmental Microbiology* **76**(10): 3378-3382.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.
- Invitrogen TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing. <http://es-ar.invitrogen.com/site/mx/es/home.html>.
- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council) (2011). Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets. EMD-1. E. M. D. T. w. i. o. Interstate Technology & Regulatory Council. Washington, D.C.
- Iverson, V., R. M. Morris, et al. (2012). "Untangling Genomes from Metagenomes: Revealing an Uncultured Class of Marine Euryarchaeota." *Science* **335**(6068): 587-590.
- Jacobsen, C. S. and O. F. Rasmussen (1992). "Development and Application of a New Method To Extract Bacterial DNA from Soil Based on Separation of Bacteria from Soil with Cation-Exchange Resin." *Appl Environ Microbiol* **58**(8): 2458-62.
- Jiménez, N., M. Viñas, et al. (2011). "Polyphasic approach for assessing changes in an autochthonous marine bacterial community in the presence of *Prestige* fuel oil and its biodegradation potential." *Appl Microbiol Biotechnol* **91**(3): 823-834.
- Johnson, E. L. and M. R. Hyman (2006). "Propane and n-Butane Oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(1): 950-952.
- Juhasz, A. L. and R. Naidu (2000). "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene." *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**(1-2): 57-88.
- Julsing, M. K., M. Schrewe, et al. (2012). "Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* **78**(16): 5724-33.
- Jurelevicius, D., V. M. Alvarez, et al. (2013). "The Use of a Combination of *alkB* Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria." *PLoS One* **8**(6): e66565.



- Kahng, H. Y., A. M. Byrne, et al. (2000). "Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1." J Bacteriol **182**(5): 1232-42.
- Kämpfer, P. (2010). Actinobacteria. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**: 1819-1838.
- Kanehisa, M. and S. Goto (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." Nucleic Acids Res **28**(1): 27-30.
- Kappell, A. D., Y. Wei, et al. (2014). "The polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential of Gulf of Mexico native coastal microbial communities after the Deepwater Horizon oil spill." Frontiers in Microbiology **5**.
- Kasai, Y., J. Inoue, et al. (2001). "The TOL Plasmid pWW0 *xylN* Gene Product from *Pseudomonas putida* Is Involved in m-Xylene Uptake." Journal of Bacteriology **183**(22): 6662-6666.
- Kauppi, S., M. Romantschuk, et al. (2012). "Natural attenuation is enhanced in previously contaminated and coniferous forest soils." Environ Sci Pollut Res Int **19**(1): 53-63.
- Kertesz, M. and A. Kawasaki (2010). Hydrocarbon-Degrading Sphingomonads: Sphingomonas, Sphingobium, Novosphingobium, and Sphingopyxis. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**: 1694-1705.
- Kim, B. S., S. Y. Kim, et al. (2007). "Sequence-based screening for self-sufficient P450 monooxygenase from a metagenome library." Journal of Applied Microbiology **102**(5): 1392-1400.
- Kim, S. J. and K. K. Kwon (2010). Marine, Hydrocarbon-Degrading Alphaproteobacteria. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag **3**: 1707-1714.
- Kim, S. J., C. M. Lee, et al. (2008). "Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria." FEMS Microbiol Lett **282**(1): 44-51.
- Kimes, N. E., A. V. Callaghan, et al. (2013). "Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill." Front Microbiol **4**(50): 2013.
- Klein, B., V. Grossi, et al. (2008). "Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane--water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17." Res Microbiol **159**(2): 137-44.
- Kodama, Y., L. I. Stiknowati, et al. (2008). "*Thalassospira tepidiphila* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from seawater." Int J Syst Evol Microbiol **58**(3): 711-715.
- Kok, M., R. Oldenhuis, et al. (1989). "The *Pseudomonas oleovorans* *alkBAC* operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase." Journal of Biological Chemistry **264**(10): 5442-5451.
- Kok, M., R. Oldenhuis, et al. (1989). "The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression." J Biol Chem **264**(10): 5435-41.
- Konopka, A. (2009). "What is microbial community ecology?" Isme J **3**(11): 1223-30.
- Kostka, J. E., O. Prakash, et al. (2011). "Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill." Appl Environ Microbiol **77**(22): 7962-7974.
- Kotani, T., Y. Kawashima, et al. (2006). "Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7." J Biosci Bioeng **102**(3): 184-92.
- Kotani, T., T. Yamamoto, et al. (2003). "Propane Monooxygenase and NAD<sup>+</sup>-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase in Propane Metabolism by *Gordonia* sp. Strain." Journal of Bacteriology **185**(24): 7120-7128.
- Kotani, T., H. Yurimoto, et al. (2007). "Novel Acetone Metabolism in a Propane-Utilizing Bacterium, *Gordonia* sp. Strain TY-5." Journal of Bacteriology **189**(3): 886-893.
- Krause, L., N. N. Diaz, et al. (2008). "Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments." Nucleic Acids Res **36**(7): 2230-9.
- Kube, M., T. N. Chernikova, et al. (2013). "Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica*." Nat Commun **4**.

- Kuhn, E., G. S. Bellicanta, et al. (2009). "New *alk* genes detected in Antarctic marine sediments." *Environ Microbiol* **11**(3): 669-673.
- Kurth, E. G., D. M. Doughty, et al. (2008). "Involvement of BmoR and BmoG in n-alkane metabolism in 'Pseudomonas butanovora'." *Microbiology* **154**(Pt 1): 139-47.
- Kuske, C. R., S. M. Barns, et al. (1997). "Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions." *Appl Environ Microbiol* **63**(9): 3614-21.
- Kvenvolden, K. A. and C. K. Cooper (2003). "Natural seepage of crude oil into the marine environment." *Geo-Marine Letters* **23**(3-4): 140-146.
- Kwon, K. K., H. S. Lee, et al. (2006). "Yeosuana aromativorans gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium belonging to the family Flavobacteriaceae, isolated from estuarine sediment of the South Sea, Korea." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 4): 727-32.
- Lai, Q., Y. Liu, et al. (2014). "Multilocus Sequence Analysis for Assessment of Phylogenetic Diversity and Biogeography in *Thalassospira* Bacteria from Diverse Marine Environments." *PLoS One* **9**(9): e106353.
- Lai, Q. and Z. Shao (2012). "Genome sequence of an alkane-degrading bacterium, Alcanivorax pacificus type strain W11-5, isolated from deep sea sediment." *J Bacteriol* **194**(24): 6936.
- LaMontagne, M. G., I. Leifer, et al. (2004). "Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments." *Environ Microbiol* **6**(8): 799-808.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, John Wiley & Sons 115-148.
- Lanfranconi, M. P., R. Bosch, et al. (2010). "Short-term changes in the composition of active marine bacterial assemblages in response to diesel oil pollution." *Microb Biotechnol* **3**(5): 607-21.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Leff, L. G., J. R. Dana, et al. (1995). "Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments." *61*(3): 1141-3.
- Leys, N. M., L. Bastiaens, et al. (2005). "Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil." *Appl Microbiol Biotechnol* **66**(6): 726-36.
- Li, H., Y. Yu, et al. (2009). "Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean." *Extremophiles* **13**(2): 233-246.
- Li, L., X. Liu, et al. (2008). "Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase." *J Mol Biol* **376**(2): 453-65.
- Lin, S. Y., W. Y. Shieh, et al. (2013). "Complete Genome Sequence of Simiduia agarivorans SA1(T), a Marine Bacterium Able To Degrade a Variety of Polysaccharides." *Genome Announc* **1**(1): pii:e00039-12.
- Little, A. E. F., C. J. Robinson, et al. (2008). "Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities." *Annual Review of Microbiology* **62**(1): 375-401.
- Liu, C., W. Wang, et al. (2011). "Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, Alcanivorax dieselolei B-5." *Environ Microbiol* **13**(5): 1168-78.
- Liu, Z., T. Z. DeSantis, et al. (2008). "Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers." *Nucleic Acids Res* **36**(18): e120.
- Lo Giudice, A., V. Bruni, et al. (2010). Psychrophiles - Cold-Adapted Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. K. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**: 1898-1976.
- Loewen, P. C. and R. Hengge-Aronis (1994). "The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation." *Annu Rev Microbiol* **48**: 53-80.
- Loviso, C. L. (2014). Análisis Metagenómico de la Biodegradación de Hidrocarburos Atomáticos Policíclicos en Sedimentos Marinos Subantárticos, Universidad Nacional de La Plata. **Tesis Doctoral**.
- Lozada, M., M. S. Marcos, et al. (2014). "The bacterial community structure of hydrocarbon-polluted marine environments as the basis for the definition of an ecological index of hydrocarbon exposure." *Microbes Environ* **29**(3): 269-76.

- Lozada, M., M. S. Marcos, et al. (2014). La Biorremediación de Ambientes Costeros contaminados con Hidrocarburos. Rawson, Chubut; , Fondo Editorial Provincial.
- Lozada, M., J. P. Riva Mercadal, et al. (2008). "Novel aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes from coastal marine sediments of Patagonia." BMC Microbiol. **8**: 50.
- Ludwig, W., O. Strunk, et al. (1998). "Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis." Electrophoresis **19**(4): 554-68.
- Luo, C., D. Tsementzi, et al. (2012). "Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample." PLoS One **7**(2): e30087.
- Maarit Niemi, R., I. Heiskanen, et al. (2001). "Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia." J Microbiol Methods **45**(3): 155-65.
- Maeng, J. H., Y. Sakai, et al. (1996). "Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in Acinetobacter sp. strain M-1." J Bacteriol **178**(13): 3695-700.
- Magurran, A. E. (2004). Measuring biological diversity. Malden, Massachusetts, USA, Blackwell Science Ltd.
- Maier, T., H. H. Forster, et al. (2001). "Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from Acinetobacter sp. EB104." Biochem Biophys Res Commun **286**(3): 652-8.
- Marcos, M. S. (2012). Estudio de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos en los sedimentos marinos de la costa Patagónica. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Bahía Blanca, Universidad Nacional del Sur. **Tesis de Doctor en Biología**: 250.
- Marcos, M. S., M. Lozada, et al. (2012). "Abundance, Dynamics, and Biogeographic Distribution of Seven Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase Gene Variants in Coastal Sediments of Patagonia." Applied and Environmental Microbiology **78**(5): 1589-1592.
- Marcos, M. S., M. Lozada, et al. (2009). "Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments." Lett Appl Microbiol **49**(5): 602-608.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-80.
- Marin, M. M., T. H. Smits, et al. (2001). "The alkane hydroxylase gene of Burkholderia cepacia RR10 is under catabolite repression control." J Bacteriol **183**(14): 4202-9.
- Marin, M. M., L. Yuste, et al. (2003). "Differential expression of the components of the two alkane hydroxylases from Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **185**(10): 3232-7.
- Markowitz, V. M., I. M. Chen, et al. (2013). "IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D115-22.
- Markowitz, V. M., F. Korzeniewski, et al. (2006). "The integrated microbial genomes (IMG) system." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D344-8.
- Marshall, A. G. and R. P. Rodgers (2004). "Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis." Acc Chem Res **37**(1): 53-9.
- McGenity, T. J., B. D. Folwell, et al. (2012). "Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions." Aquat Biosyst **8**(1): 2046-9063.
- McKew, B. A., F. Coulon, et al. (2007). "Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK." Environ Microbiol **9**(1): 165-176.
- McKew, B. A., F. Coulon, et al. (2007). "Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria." Environ. Microbiol. **9**(6): 1562-1571.
- McLean, J. S., M.-J. Lombardo, et al. (2013). "Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(26): E2390-E2399.
- Meyer, F., D. Paarmann, et al. (2008). "The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes." BMC Bioinformatics **9**(386): 1471-2105.
- Mooney, A., N. D. O'Leary, et al. (2006). "Cloning and functional characterization of the styE gene, involved in styrene transport in Pseudomonas putida CA-3." Appl Environ Microbiol **72**(2): 1302-9.

- Morales, G., A. Ugidos, et al. (2006). "Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases." *Environ Microbiol* **8**(10): 1764-74.
- Moreno, R., S. Marzi, et al. (2009). "The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation." *Nucleic Acids Res.* **37**(22): 7678-90.
- Moriya, K. and K. Horikoshi (2002). Microorganism belong to the genus *Flavobacterium*, hydrocarbon emulsifier and solubilizer and separation method for organic-solvent tolerant microorganism. European Patent. **EP05036046**.
- Moriya, Y., M. Itoh, et al. (2007). "KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): 25.
- Morris, R. M., M. S. Rappe, et al. (2002). "SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities." *Nature* **420**(6917): 806-10.
- Morrone, J. J. (2000). "Biogeographic delimitation of the Subantarctic subregion and its provinces." *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* **2**(1): 1-15.
- Murrell, J. C. and T. J. Smith (2010). Biochemistry and Molecular Biology of Methane Monooxygenase. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1045-1056.
- Nealson, K. H. (1997). "SEDIMENT BACTERIA: Who's There, What Are They Doing, and What's New?" *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **25**(1): 403-434.
- Nelson, K. E., C. Weinel, et al. (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* **4**(12): 799-808.
- Nie, Y., C.-Q. Chi, et al. (2014). "Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments." *Sci. Rep.* **4**.
- Nievas, M. L. and J. L. Esteves (2007). Relevamiento de actividades relacionadas con la explotación de petróleo en zona costera patagónica y datos preliminares sobre residuos de hidrocarburos en puertos. Fundación Patagonia Natural. Puerto Madryn.
- NRC National Research Council (2003). *Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects*. Washington, D.C., National Academies Press.
- Ogino, A., H. Koshikawa, et al. (2001). "Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses." *J Appl Microbiol* **91**(4): 625-35.
- Ogram, A., G. S. Sayler, et al. (1987). "The extraction and purification of microbial DNA from sediments." *Journal of Microbiological Methods* **7**(2-3): 57-66.
- Olivera, N. L., M. L. Nievas, et al. (2009). "Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis." *Res Microbiol* **160**: 19-26.
- Olson, D. M. and E. Dinerstein (2002). "The Global 200: Priority Ecoregions for Global Conservation." *Ann. Missouri Bot. Gard.* **89**: 199-224.
- Overbeek, R., R. Olson, et al. (2014). "The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST)." *Nucleic Acids Research* **42**(D1): D206-D214.
- Paisse, S., R. Duran, et al. (2011). "Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments?" *Appl Microbiol Biotechnol* **92**(4): 835-844.
- Palatinszky, M., M. Nikolausz, et al. (2011). "Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products--a factor causing bias in microbial community structure analysis." *J Microbiol Methods* **85**(2): 131-6.
- Panke, S., A. Meyer, et al. (1999). "An Alkane-Responsive Expression System for the Production of Fine Chemicals." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2324-2332.
- Parales, R. E. and J. L. Ditty (2010). Substrate Transport. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1545-1554.
- Park, H. J., J. H. Jeon, et al. (2007). "Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome." *Protein Expr Purif* **52**(2): 340-7.
- Pereira, G., E. Terenziani, et al. (2010). Hydrocarbon degradation by Planctomycetes. *Libro de Resúmenes*. IJUP 3rd Meeting of Young Researchers University of Porto: 268.

- Pérez-de-Mora, A., M. Engel, et al. (2010). "Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes." *Microb Ecol* **62**(4): 959-972.
- Petruschka, L., G. Burchhardt, et al. (2001). "The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation." *Mol Genet Genomics* **266**(2): 199-206.
- Piette, F., S. D'Amico, et al. (2012). "Life in the Cold: a Proteomic Study of Cold-Repressed Proteins in the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125." *Applied and Environmental Microbiology* **77**(11): 3881-3883.
- Powell, S. M., S. H. Ferguson, et al. (2006). "Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation." *Microb Ecol* **52**(3): 523-32.
- Prabakaran, S. R., R. Manorama, et al. (2007). "Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica." *FEMS Microbiol Ecol* **59**(2): 342-55.
- Prefectura Naval Argentina (1998). Designación de zonas de protección especial en el litoral Argentino. Ordenanza N°12/98 (DPMA), Tomo 6: Régimen para la Protección del Medio Ambiente. Prefectura Naval Argentina. Buenos Aires: 30.
- Prince, R. C., A. Gramain, et al. (2010). Prokaryotic Hydrocarbon Degradation. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**: 1671-1692.
- Procópio, L., M. de Cassia Pereira e Silva, et al. (2013). "Transcriptional profiling of genes involved in *n*-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamea* P4 strain." *Braz J Microbiol* **44**(2): 633-41.
- Punta, M., P. C. Coghill, et al. (2012). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Research* **40**(D1): D290-D301.
- Quaiser, A., T. Ochsenreiter, et al. (2003). "Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics." *Mol Microbiol* **50**(2): 563-75.
- Quast, C., E. Pruesse, et al. (2013). "The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools." *Nucleic Acids Research* **41**.
- Quevillon, E., V. Silventoinen, et al. (2005). "InterProScan: protein domains identifier." *Nucleic Acids Research* **33**(suppl 2): W116-W120.
- Rappé, M. S. and S. J. Giovannoni (2003). "The uncultured microbial majority." *Annu Rev Microbiol* **57**: 369-94.
- Ratajczak, A., W. Geissdorfer, et al. (1998). "Alkane Hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 Is Encoded by *alkM* and Belongs to a New Family of Bacterial Integral-Membrane Hydrocarbon Hydroxylases." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(4): 1175-1179.
- Ratajczak, A., W. Geissdorfer, et al. (1998). "Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 is induced by a broad range of *n*-alkanes and requires the transcriptional activator *AlkR*." *J Bacteriol* **180**(22): 5822-7.
- Reva, O. N., P. F. Hallin, et al. (2008). "Global features of the *Alcanivorax borkumensis* SK2 genome." *Environ Microbiol* **10**(3): 614-25.
- Rhee, S.-K., X. Liu, et al. (2004). "Detection of Genes Involved in Biodegradation and Biotransformation in Microbial Communities by Using 50-Mer Oligonucleotide Microarrays." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(7): 4303-4317.
- Riesenfeld, C. S., P. D. Schloss, et al. (2004). "Metagenomics: genomic analysis of microbial communities." *Annu Rev Genet* **38**: 525-52.
- Robertson, D. E. and B. A. Steer (2004). "Recent progress in biocatalyst discovery and optimization." *Curr Opin Chem Biol* **8**(2): 141-9.
- Roesch, L. F., R. R. Fulthorpe, et al. (2007). "Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity." *Isme J* **1**(4): 283-90.
- Rojo, F. (2009). "Degradation of alkanes by bacteria." *Environ Microbiol* **11**(10): 2477-2490.
- Rojo, F. (2010). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 781-797.

- Rojo, F. (2010). Genetic Features and Regulation of n-Alkane Metabolism. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 1141-1154.
- Röling, W. F., M. G. Milner, et al. (2002). "Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation." Appl Environ Microbiol **68**(11): 5537-5548.
- Rolling, W. F. M. and P. M. van Bodegom (2014). "Toward quantitative understanding on microbial community structure and functioning: a modeling-centered approach using degradation of marine oil spills as example." Front Microbiol **5**(125).
- Ron, E. Z. and E. Rosenberg (2014). "Enhanced bioremediation of oil spills in the sea." Current Opinion in Biotechnology **27**(0): 191-194.
- Rosenberg, E., R. Legman, et al. (1996). "Oil bioremediation using insoluble nitrogen source." J Biotechnol **51**(3): 273-8.
- Rosenberg, M., E. A. Bayer, et al. (1982). "Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane." Appl Environ Microbiol **44**(4): 929-37.
- Rutherford, K., J. Parkhill, et al. (2000). "Artemis: sequence visualization and annotation." Bioinformatics **16**(10): 944-5.
- S., C. and Y. M. M. (2010). Alcanivorax. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**: 1737-1748.
- Sabirova, J. S., A. Becker, et al. (2011). "Transcriptional profiling of the marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* during growth on n-alkanes." FEMS Microbiology Letters **319**(2): 160-168.
- Sabirova, J. S., T. N. Chernikova, et al. (2008). "Niche-specificity factors of a marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2." FEMS Microbiol Lett **285**(1): 89-96.
- Sabirova, J. S., M. Ferrer, et al. (2006). "Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization." J Bacteriol **188**(11): 3763-73.
- Sakai, Y., J. H. Maeng, et al. (1994). "Use of Long-chain n-alkanes (C<sub>13</sub>-C<sub>44</sub>) by an Isolate, *Acinetobacter* sp. M-1." Biosci. Biotech. Biochem. **58**(11): 2128-2130.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Appendix 2: Media. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **3**: A2.1.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Chapter 1: Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 1.112-1.115.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Chapter 1: Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 1.31-1.42.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Chapter 5: Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 5.4-5.13.
- Sammarco, P. W., S. R. Kolian, et al. (2013). "Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico." Marine Pollution Bulletin **73**(1): 129-143.
- Sayavedra-Soto, L. A., N. Hamamura, et al. (2011). "The membrane-associated monooxygenase in the butane-oxidizing Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain CF8 is a novel member of the AMO/PMO family." Environmental Microbiology Reports **3**(3): 390-396.
- Scheller, U., T. Zimmer, et al. (1998). "Oxygenation Cascade in Conversion of n-Alkanes to  $\alpha,\omega$ -Dioic Acids Catalyzed by Cytochrome P450 52A3." Journal of Biological Chemistry **273**(49): 32528-32534.
- Schleper, C., R. V. Swanson, et al. (1997). "Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*." J Bacteriol **179**(24): 7803-11.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2003). "Biotechnological prospects from metagenomics." Current Opinion in Biotechnology **14**(3): 303-310.

- Schloss, P. D. and J. Handelsman (2005). "Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness." Applied and Environmental Microbiology **71**(3): 1501-1506.
- Schloss, P. D. and S. L. Westcott (2011). "Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis." Appl Environ Microbiol **77**(10): 3219-3226.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, et al. (2009). "Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." Appl Environ Microbiol **75**(23): 7537-7541.
- Schneiker, S., V. A. Martins dos Santos, et al. (2006). "Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*." Nat Biotechnol **24**(8): 997-1004.
- Schrewe, M., A. O. Magnusson, et al. (2011). "Kinetic Analysis of Terminal and Unactivated C-H Bond Oxyfunctionalization in Fatty Acid Methyl Esters by Monooxygenase-Based Whole-Cell Biocatalysis." Advanced Synthesis & Catalysis **353**(18): 3485-3495.
- Selengut, J. D., D. H. Haft, et al. (2007). "TIGRFAMs and Genome Properties: tools for the assignment of molecular function and biological process in prokaryotic genomes." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): 6.
- Shanklin, J., C. Achim, et al. (1997). "Mossbauer studies of alkane omega-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2981-6.
- Shanklin, J. and E. Whittle (2003). "Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane  $\omega$ -hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family." FEBS Lett **545**(2-3): 188-92.
- Shanklin, J., E. Whittle, et al. (1994). "Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase." Biochemistry **33**(43): 12787-94.
- Shen, F. T., L. S. Young, et al. (2010). "Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene from *Gordonia* spp." Syst Appl Microbiol **33**(2): 53-9.
- Simon, C. and R. Daniel (2010). Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. Methods in Molecular Biology. W. R. Streit and R. Daniel, Springer Science+Business Media. **668**: 39-50.
- Simpson, E. H. (1949). "Measurement of diversity." Nature **163**: 688.
- Sluis, M. K., L. A. Sayavedra-Soto, et al. (2002). "Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from 'Pseudomonas butanovora'." Microbiology **148**(Pt 11): 3617-29.
- Smith, T. J., Y. A. Trotsenko, et al. (2010). Physiology and Biochemistry of the Aerobic Methane Oxidizing Bacteria. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**: 767-780.
- Smits, T., B. Witholt, et al. (2003). "Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*." Antonie van Leeuwenhoek **84**(3): 193-200.
- Smits, T. H., S. B. Balada, et al. (2002). "Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria." J Bacteriol **184**(6): 1733-42.
- Smits, T. H., M. Röthlisberger, et al. (1999). "Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains." Environ Microbiol **1**(4): 307-317.
- Sobek S., Durisch-Kaiser E., et al. (2009). "Organic carbon burial efficiency in lake sediments controlled by oxygen exposure time and sediment source." Limnol. Oceanogr. **54**(6): 2243-2254.
- Sogin, M. L., H. G. Morrison, et al. (2006). "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(32): 12115-12120.
- Solovyev V. and Salamov A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies. E. R. W. Li, Nova Science Publishers: 61-78.
- Sotsky, J. B., C. W. Greer, et al. (1994). "Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments." Can J Microbiol **40**(11): 981-5.

- Staijen, I. E., R. Marcionelli, et al. (1999). "The PalkBFGHJKL promoter is under carbon catabolite repression control in *Pseudomonas oleovorans* but not in *Escherichia coli* alk+ recombinants." *J Bacteriol* **181**(5): 1610-6.
- Steffan, R. J., J. Goksoyr, et al. (1988). "Recovery of DNA from soils and sediments." *54*(12): 2908-15.
- Sticher, P., M. C. Jaspers, et al. (1997). "Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(10): 4053-4060.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen." *Nature* **406**(6799): 959-64.
- Suenaga, H., T. Ohnuki, et al. (2007). "Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds." *Environ Microbiol* **9**(9): 2289-97.
- Sun, Y., Y. Cai, et al. (2009). "ESPRIT: estimating species richness using large collections of 16S rRNA pyrosequences." *Nucleic Acids Research* **37**(10): e76.
- Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni (1996). "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2): 625-30.
- Tamura, K., D. Peterson, et al. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." *Mol Biol Evol* **28**(10): 2731-9.
- Tan, H. M. (1999). "Bacterial catabolic transposons." *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(1): 1-12.
- Tani, A., T. Ishige, et al. (2001). "Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1." *J Bacteriol* **183**(5): 1819-23.
- Tao T. (2010). Standalone BLAST Setup for Windows PC. *BLAST® Help. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52637/>.
- Tatusov, R. L., M. Y. Galperin, et al. (2000). "The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution." *Nucleic Acids Res* **28**(1): 33-6.
- Temperton, B., D. Field, et al. (2009). "Bias in assessments of marine microbial biodiversity in fosmid libraries as evaluated by pyrosequencing." *Isme J* **3**(7): 792-6.
- Thomas, T., J. Gilbert, et al. (2012). "Metagenomics - a guide from sampling to data analysis." *Microbial Informatics and Experimentation* **2**(3).
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-4882.
- Throne-Holst, M., S. Markussen, et al. (2006). "Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases." *Appl Microbiol Biotechnol* **72**(2): 353-60.
- Throne-Holst, M., A. Wentzel, et al. (2007). "Identification of Novel Genes Involved in Long-Chain n-Alkane Degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874 10.1128/AEM.00064-07." *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(10): 3327-3332.
- Touw, D. S., D. R. Patel, et al. (2010). "The crystal structure of OprG from *Pseudomonas aeruginosa*, a potential channel for transport of hydrophobic molecules across the outer membrane." *PLoS One* **5**(11): e15016.
- Tringe, S. G., C. von Mering, et al. (2005). "Comparative Metagenomics of Microbial Communities." *Science* **308**(5721): 554-557.
- Tsai, Y. L. and B. H. Olson (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments, *Appl Environ Microbiol.* 1991 Apr;57(4):1070-4.
- Tyson, G. W., J. Chapman, et al. (2004). "Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment." *Nature* **428**(6978): 37-43.
- Uchiyama, T. and K. Miyazaki (2009). "Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening." *Curr Opin Biotechnol* **20**(6): 616-22.
- Uchiyama, T. and K. Watanabe (2008). "Substrate-induced gene expression (SIGEX) screening of metagenome libraries." *Nat Protoc* **3**(7): 1202-12.



- United Nations Environment Programme (1992). Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies No 20. UNEP, UNEP/IOC/IAEA. **20**: 1-75.
- Urlacher, V. B. and M. Girhard (2012). "Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application." Trends Biotechnol **30**(1): 26-36.
- van Beilen, J. B., G. Eggink, et al. (1992). "DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*." Mol Microbiol **6**(21): 3121-36.
- van Beilen, J. B. and E. G. Funhoff (2007). "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation." Appl Microbiol Biotechnol **74**(1): 13-21.
- van Beilen, J. B., E. G. Funhoff, et al. (2006). "Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases." Appl Environ Microbiol **72**(1): 59-65.
- van Beilen, J. B., M. M. Marin, et al. (2004). "Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*." Environ Microbiol **6**(3): 264-73.
- van Beilen, J. B., M. Neuenschwander, et al. (2002). "Rubredoxins involved in alkane oxidation." J Bacteriol **184**(6): 1722-32.
- van Beilen, J. B., S. Panke, et al. (2001). "Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes." Microbiology **147**(6): 1621-1630.
- van Beilen, J. B., D. Penninga, et al. (1992). "Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*." J Biol Chem **267**(13): 9194-201.
- van Beilen, J. B., T. H. Smits, et al. (2005). "Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases." J Bacteriol **187**(1): 85-91.
- van Beilen, J. B., T. H. Smits, et al. (2002). "Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains." Environ Microbiol **4**(11): 676-82.
- van Beilen, J. B., T. H. M. Smits, et al. (2005). "Identification of an Amino Acid Position That Determines the Substrate Range of Integral Membrane Alkane Hydroxylases." J. Bacteriol. **187**(1): 85-91.
- van Beilen, J. B., M. G. Wubbolts, et al. (1994). "Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*." Biodegradation **5**(3-4): 161-74.
- van Beilen, J. B., L. Z., et al. (2003). "Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment." Oil and Gas Science and Technology **58**: 427-440.
- Van de Peer, Y., S. Chapelle, et al. (1996). "A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA." Nucleic Acids Res **24**(17): 3381-91.
- Venter, J. C., K. Remington, et al. (2004). "Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea." Science **304**(5667): 66-74.
- Voudrias, E. A. and C. L. Smith (1986). "Hydrocarbon pollution from marinas in estuarine sediments." Estuarine, Coastal and Shelf Science **22**(3): 271-284.
- Wackett, L. P. (2010). Aliphatic Hydrocarbon Producers. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **1**: 609-614.
- Wagner-Dobler, I. and H. Biebl (2006). "Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage." Annu Rev Microbiol **60**: 255-80.
- Wagner, M. and M. Horn (2006). "The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance." Curr Opin Biotechnol **17**(3): 241-9.
- Wang, L., L. Liu, et al. (2013). "Analysis of the bacterial community in the two typical intertidal sediments of Bohai Bay, China by pyrosequencing." Mar Pollut Bull **72**(1): 181-7.
- Wang, L., W. Wang, et al. (2010). "Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean." Environ Microbiol **12**(5): 1230-1242.
- Wang, Q., G. M. Garrity, et al. (2007). "Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy." Appl Environ Microbiol **73**(16): 5261-7.
- Wang, W. and Z. Shao (2012). "Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes." FEMS Microbiol Ecol **80**(3): 523-33.

- Wang, W. and Z. Shao (2012). "Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3." *Appl Microbiol Biotechnol* **94**(2): 437-48.
- Wang, W. and Z. Shao (2013). "Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation." *Frontiers in Microbiology* **4**(116).
- Wang, W., L. Wang, et al. (2010). "Diversity and Abundance of Oil-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (*alkB*) Genes in the Subtropical Seawater of Xiamen Island." *Microbial Ecology* **60**(2): 429-439.
- Wang, Y., M. Rawlings, et al. (1995). "Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1." *Mol Gen Genet* **246**(5): 570-9.
- Wang, Y., M. Yu, et al. (2012). "*Oleispira lenta* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from Yellow sea coastal seawater in Qingdao, China." *Antonie van Leeuwenhoek* **in press**.
- Wang, Z. and M. F. Fingas (2003). "Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques." *Marine Pollution Bulletin* **47**(9-12): 423-452.
- Ward, N. L., F. A. Rainey, et al. (2000). "Comparative phylogenetic analyses of members of the order Planctomycetales and the division Verrucomicrobia: 23S rRNA gene sequence analysis supports the 16S rRNA gene sequence-derived phylogeny." *Int J Syst Evol Microbiol* **6**: 1965-72.
- Wasmund, K., K. A. Burns, et al. (2009). "Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia." *Appl Environ Microbiol* **75**(23): 7391-8.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, et al. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." *Journal of Bacteriology* **173**(2): 697-703.
- Wentzel, A., T. E. Ellingsen, et al. (2007). "Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes." *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(6): 1209-21.
- Whyte, L. G., J. Hawari, et al. (1998). "Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp." *Appl Environ Microbiol* **64**(7): 2578-84.
- Whyte, L. G., S. J. Slagman, et al. (1999). "Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15." *Appl Environ Microbiol* **65**(7): 2961-8.
- Whyte, L. G., T. H. Smits, et al. (2002). "Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531." *Appl Environ Microbiol* **68**(12): 5933-42.
- Wild, J., Z. Hradecna, et al. (2002). "Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones." *Genome Res* **12**(9): 1434-44.
- Wilkes, H. and J. Schwarzbauer (2010). Hydrocarbons: An Introduction to Structure, Physico-Chemical Properties and Natural Occurrence. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **1**: 3-48.
- Woebken, D., H. Teeling, et al. (2007). "Fosmids of novel marine Planctomycetes from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes." *Isme J* **1**(5): 419-35.
- Wooley, J. C. and Y. Ye (2009). "Metagenomics: Facts and Artifacts, and Computational Challenges\*." *J Comput Sci Technol* **25**(1): 71-81.
- Wu, L., L. Kellogg, et al. (2008). "Microarray-Based Characterization of Microbial Community Functional Structure and Heterogeneity in Marine Sediments from the Gulf of Mexico." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(14): 4516-4529.
- Xu, K., Y. Tang, et al. (2013). "Diversity and abundance of *n*-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field." *Biogeosciences* **10**(3): 2041-2048.
- Xu, M., X. Xiao, et al. (2008). "Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment." *Extremophiles* **12**(2): 255-262.
- Yakimov, M. M., G. Gentile, et al. (2004). "Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria." *FEMS Microbiology Ecology* **49**(3): 419-432.

- Yakimov, M. M., L. Giuliano, et al. (2004). "*Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 1): 141-8.
- Yakimov, M. M., L. Giuliano, et al. (2003). "*Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water." Int J Syst Evol Microbiol **53**(3): 779-785.
- Yakimov, M. M., P. N. Golyshin, et al. (1998). "*Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium." Int J Syst Bacteriol **48** (Pt 2): 339-48.
- Yakimov, M. M., K. N. Timmis, et al. (2007). "Obligate oil-degrading bacteria." Curr Opin Biotechnol **18**: 257-266.
- Yang, T., L. M. Nigro, et al. (2014). "Pulsed blooms and persistent oil-degrading bacterial populations in the water column during and after the Deepwater Horizon blowout."
- Yergeau, E., S. Sanschagrin, et al. (2012). "Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils." PLoS One **7**(1): e30058.
- Yuste, L., I. Canosa, et al. (1998). "Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." J Bacteriol **180**(19): 5218-26.
- Yuste, L., M. E. Corbella, et al. (2000). "Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing." FEMS Microbiol Ecol **32**(1): 69-75.
- Yuste, L. and F. Rojo (2001). "Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway." J Bacteriol **183**(21): 6197-206.
- Zhang, Z., S. Schwartz, et al. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences." J Comput Biol **7**(1-2): 203-14.
- Zhao, B., H. Wang, et al. (2010). "*Thalassospira xianhensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **60**(5): 1125-1129.
- Zhou, J., M. A. Bruns, et al. (1996). "DNA recovery from soils of diverse composition." Applied and Environmental Microbiology **62**(2): 316-22.
- Zhu, D., S.-H. Tanabe, et al. (2013). "Bacterial Community Composition of South China Sea Sediments through Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes." PLoS One **8**(10): e78501.
- Zinger, L., L. A. Amaral-Zettler, et al. (2011). "Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems." PLoS One **6**(9): e24570.